

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR  
FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE  
PROF. DR. O. ORTMANN  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Untersuchung der Expression von Progesteronrezeptor-Spleißvarianten  
bei Mammakarzinom-Patientinnen

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Isabel Merx

2015



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR  
FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE  
PROF. DR. O. ORTMANN  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Untersuchung der Expression von Progesteronrezeptor-Spleißvarianten  
bei Mammakarzinom-Patientinnen

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Isabel Merx

2015

|                             |                                   |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| Dekan:                      | Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert |
| 1. Berichterstatter:        | Prof. Dr. rer. nat. Oliver Treeck |
| 2. Berichterstatter:        | Prof. Dr. Olaf Ortmann            |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 25.01.2016                        |

# Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| 1. Einleitung.....  | 5  |
| 1.1 Das Mammakarzinom .....                                 | 5  |
| 1.1.1 Epidemiologie .....                                   | 5  |
| 1.1.2 Ätiologie.....  | 5  |
| 1.1.3 Therapieoptionen.....                                 | 6  |
| 1.1.4 Prognostische und prädiktive Faktoren .....           | 7  |
| 1.1.5 Hormonrezeptorstatus .....                            | 7  |
| 1.1.6 Genexpressionsanalysen .....                          | 9  |
| 1.2 Der Progesteronrezeptor und seine Spleißvarianten ..... | 10 |
| 1.2.1 Aufbau .....  | 10 |
| 1.2.2 PR-Isoformen .....                                    | 12 |
| 1.2.2 Alternatives Spleißen .....                           | 13 |
| 1.2.3 Spleißvarianten.....                                  | 15 |
| 2. Fragestellung.....                                       | 18 |
| 3. Materialien .....  | 19 |
| 4. Methoden.....  | 22 |
| 4.1 Gewebe .....  | 22 |
| 4.2 cDNA-Synthese .....                                     | 22 |
| 4.3 Herstellung spezifischer Kalibratoren.....              | 23 |
| 4.4 Gelelektrophorese.....                                  | 25 |
| 4.5 Real time-PCR und Schmelzkurvenanalyse .....            | 27 |
| 4.6 Marker.....   | 33 |
| 4.7 Auswertung und Statistik.....                           | 34 |

|   |     |
|---|-----|
| 5. Ergebnisse.....  | 36  |
| 5.1 Expressionsprofile der Spleißvarianten.....                           | 36  |
| 5.2 Codierung der Expressionsprofile .....                                | 43  |
| 5.3 Subgruppenvergleiche der Spleißvarianten .....                        | 44  |
| 5.4 Korrelation der einzelnen PR-Spleißvarianten mit panPR .....          | 45  |
| 5.5 Korrelation der einzelnen PR-Spleißvarianten mit panER $\alpha$ ..... | 47  |
| 5.6 Korrelation der PR-Spleißvarianten mit verschiedenen Markern .....    | 48  |
| 5.7 „Matched Pairs“ .....   | 73  |
| 6. Diskussion .....   | 76  |
| 6.1 Expressionsprofile der Spleißvarianten.....                           | 77  |
| 6.2 Codierung der Expressionsprofile .....                                | 79  |
| 6.3 Subgruppenvergleiche .....  | 80  |
| 6.4 Korrelation der einzelnen PR-Spleißvarianten mit panPR .....          | 80  |
| 6.5 Korrelation der einzelnen PR-Spleißvarianten mit panER $\alpha$ ..... | 81  |
| 6.6 Korrelation der PR-Spleißvarianten mit verschiedenen Markern .....    | 82  |
| 6.7 „Matched Pairs“ .....   | 100 |
| 7. Zusammenfassung und Ausblick .....                                     | 102 |
| 8. Abbildungsverzeichnis .....  | 104 |
| 9. Tabellenverzeichnis .....  | 105 |
| 10. Abkürzungsverzeichnis .....   | 105 |
| 11. Literaturverzeichnis.....   | 111 |

Anhang:

Danksagung

Eidesstattliche Erklärung

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Mammakarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Den aktuellen Zahlen des Robert Koch Instituts zu Folge stellt das Mammakarzinom mit rund 1/3 aller Krebsneuerkrankungen die häufigste Tumorentität der Frau dar. In den letzten Jahren nahm die Häufigkeit der Neuerkrankungen stark zu. 2008 lag die Inzidenz bei 123,1/100.000 Frauen, womit in etwa jede achte Frau betroffen war. Ein Gipfel der altersspezifischen Erkrankungsrate zeigt sich im Bereich der 65-69jährigen Patientinnen (Erkrankungsrate 2007/2008 von 409,6/100.000 Patientinnen). Nach Einführung des Mammographie-Screenings im Jahre 2005 zeichnete sich ein deutlicher Sprung in der Inzidenz ab, da die Tumoren nun in einem früheren Stadium detektiert werden konnten und somit die Zahl der erfassten Tumoren anstieg. Die Mortalitätsrate lag 2008 in Deutschland bei 24,6/100.000 Frauen (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2012, S. 64), zeigt sich jedoch in den letzten 20 Jahren rückläufig (Malvezzi et al. 2012). Einen großen Beitrag hierzu leisteten die zahlreichen Forschungsansätze zur besseren Klassifizierung und zur spezifischeren, zielgerichteten Therapie des Mammakarzinoms.

### 1.1.2 Ätiologie

Bei der Entstehung von Brustkrebs spielen sowohl endogene als auch exogene Faktoren eine Rolle. Zu den bekannten Risikofaktoren zählen unter anderem zunehmendes Alter, eine positive Familienanamnese, eine frühe Menarche, späte Menopause, späte Schwangerschaft, Nulliparität, vorausgegangene gutartige Brusterkrankungen sowie atypische Hyperplasien und das lobuläre Carcinoma in situ. Zur Risikostratifizierung bei positiver Familienanamnese wird zwischen einer genetischen Prädisposition und einem gehäuften Auftreten von Mammakarzinomen innerhalb der Familie unterschieden (Bilimoria und Morrow 1995). Bei 5-10% der

Mammakarzinome liegt eine genetische Ursache im Sinne einer BRCA-Mutation vor. Die Betroffenen weisen ein Lebenszeitrisiko von 50-80% für die Erkrankung an Mammakarzinom, 60% für die Entstehung eines kontralateralen Mammakarzinoms sowie 15-25% für die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms auf (Goldberg und Borgen 2006). Bezüglich der Risikofaktoren spielt der Einfluss einer langen endogenen Östrogeneinwirkung eine wichtige Rolle, wie sie bei früher Menarche und später Menopause zu finden ist (Yager und Davidson 2006). Auch für exogene Östrogene, die z.B. im Rahmen einer postmenopausalen Hormonersatztherapie Anwendung finden, konnte ein nachfolgend erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Mammakarzinoms nachgewiesen werden. Den größten Einfluss scheint hierbei jedoch eine kombinierte Therapie mit Östrogenen und Gestagenen aufzuweisen (Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study 2003; Gapstur et al. 1999).

### **1.1.3 Therapieoptionen**

Zur Behandlung des Mammakarzinoms stehen verschiedene Therapieoptionen zur Verfügung, sodass ein individualisiertes Therapiekonzept im Rahmen einer interdisziplinären Tumorkonferenz für die jeweilige Patientin zusammengestellt werden kann. Das Therapiespektrum reicht von der operativen Entfernung des Tumors über eine strahlentherapeutische bis hin zur chemotherapeutischen Behandlung oder einer Kombination dergleichen. Zur medikamentösen Therapie stehen endokrine Therapeutika und Anti-Her2-Antikörper sowie beim metastasierten Mammakarzinom zusätzlich Tyrosinkinase-Inhibitoren und Angiogenese-Hemmer zur Verfügung. Zur endokrinen Therapie zählen GnRH-Analoga, selektive Östrogenmodulatoren, Aromatasehemmer und reine Östrogenrezeptorantagonisten, welche bei Patientinnen mit Östrogen- und/oder Progesteronrezeptor-positiven Tumoren zum Einsatz kommen (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF et al. 2012).



### **1.1.4 Prognostische und prädiktive Faktoren**

Mithilfe von Prognosefaktoren wird versucht, das individuelle Risiko einer Patientin zu ermitteln, um dadurch den Nutzen einer systemischen Therapie genauer definieren zu können und eine Über- oder Untertherapie zu vermeiden. Die Prognosefaktoren beschreiben also die Wahrscheinlichkeit, mit der die Patientin ohne neoadjuvante Therapie mit einer Metastasierung und Rezidivierung des Tumors rechnen muss. Zu den etablierten Prognosefaktoren gehören der TNM-Status inklusive Tumorgöße und Lymphknotenbefall, das Grading, der histologische Tumortyp, das Auftreten einer Gefäßinvasion und der Hormonrezeptorstatus. Die Expression des Ki-67-Antigens, Her2/neu-Onkoproteins sowie das Verhältnis von Plasminogenaktivator uPA und Plasminogenaktivatorinhibitor PAI-1 stellen daneben neuere Prognosefaktoren dar. Unter prädiktiven Faktoren werden Kriterien verstanden, die eine Aussage über den Effekt einer spezifischen Therapie treffen können. Zu solchen Prädiktoren zählen das Alter und der Menopausenstatus der Patientin, der Hormonrezeptorstatus, die Her2/neu-Expression sowie der Nachweis von Proliferationsmarkern, wie MIB-1, Ki-67 und uPA/PAI-1 (Kreienberg 2010).

### **1.1.5 Hormonrezeptorstatus**

Die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus wird für alle invasiven Karzinome mittels Immunhistochemie und bevorzugt an Stanzbiopsien empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF et al. 2012; Hammond et al. 2010). Hierbei ist zu beachten, dass ungefähr 20% der immunhistochemischen Bestimmungen weltweit als fehlerhaft einzustufen sind, meist aufgrund von Variationen innerhalb von präanalytischen Variablen, Angaben der Positivitätsschwelle und Interpretationskriterien. Daher ist ein Vorgehen nach bestimmten Algorithmen empfehlenswert (Hammond et al. 2010). Für die immunhistochemische Bestimmung der Rezeptoren stehen zwei anerkannte Scores zur Verfügung. Zum einen der internationale Allred-Score (Harvey et al. 1999) und zum anderen der in Deutschland etablierte immunreaktive Score nach Remmele und Stegner (Remmele und Stegner 1987). Beide Scores bewerten den prozentualen Anteil an rezeptorpositiven Kernen sowie darüberhinausgehend die Stärke der

immunhistochemischen Färbereaktion. Für die Klassifikation als rezeptorpositiver Tumor wird ein Anteil von mindestens 1% rezeptorpositiver Zellkerne erfordert (Goldhirsch et al. 2011; Hammond et al. 2010). Während zunächst hauptsächlich dem Östrogenrezeptor (ER) ein hoher prädiktiver Vorhersagewert zugesprochen wurde (Osborne et al. 1980), erfolgte in den 1980er Jahren eine prospektive Studie zur Bedeutung des Progesteronrezeptors (PR) als prädiktiver Marker. Hierbei konnte gezeigt werden, dass erhöhte PR-Level signifikant mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit eines Ansprechens auf Tamoxifen, einer längeren Zeit bis zum Versagen der Therapie und einer längeren Überlebenszeit korrelieren (Ravdin et al. 1992).

Auch weitere Studien konnten die Bedeutung des Progesteronrezeptors für das Outcome sowie für die Entscheidung zur Durchführung einer endokrinen Therapie bestätigen (Hammond et al. 2010). Folglich wurde der Bestimmung des Progesteronrezeptorstatus eine signifikante Verbesserung des prädiktiven Aussagewertes gegenüber der alleinigen Östrogenrezeptorbestimmung zugesprochen (Bardou 2003). Anfangs wurde vermutet, dass dem Progesteronrezeptor eine östrogenrezeptorabhängige Synthese zugrunde liege und somit PR-Negativität auf einen defekten ER-Signalweg schließen lasse (Horwitz und McGuire 1975). Retrospektiv konnte jedoch nachgewiesen werden, dass einige PR-negative Tumoren dennoch auf eine endokrine Therapie ansprechen (Osborne et al. 2005). Ebenso wurde ein kleiner Anteil an ER-/PR+ Tumoren gefunden, die ein besseres Ansprechen auf eine Hormontherapie als ER-/PR- Tumoren zeigen. Doppelpositive, also ER+/PR+ Tumoren, zeigen einen höheren Benefit durch adjuvante Tamoxifen-Therapie als ER+/PR- Tumoren (Horwitz und McGuire 1975; Osborne et al. 2005).

### 1.1.6 Genexpressionsanalysen

Mittels Genexpressionsanalysen durch cDNA-Mikroarrays, welche eine simultane Untersuchung von Genen ermöglichen, lässt sich das heterogene Mammakarzinom in verschiedene Subtypen einteilen. Diese Einteilung dient einer Verbesserung der prognostischen und prädiktiven Aussagemöglichkeit (Perou et al. 2000; Sorlie 2001; Kreienberg 2010). Alternativ kann mittels Immunhistochemie eine Annäherung an diese intrinsischen Subtypen erfolgen. Hierbei muss die Möglichkeit zur verlässlichen Messung der Einzelkomponenten gegeben sein, was sich am besten durch das Vorgehen nach Guidelines erreichen lässt (Goldhirsch et al. 2011; Hammond et al. 2010).

Anhand der Subtypen, wie sie in Tabelle 1 klassifiziert sind, kann eine Therapieentscheidung orientiert werden. Beispielsweise wird eine alleinige endokrine Therapie für Luminal-A-Subtypen, eine Kombination aus endokriner und chemotherapeutischer Behandlung für Luminal-B-Subtypen sowie eine zusätzliche anti-Her-2-Therapie bei HER-2-Positivität und eine Chemotherapie bei den meisten dreifach-negativen Karzinomen vorgeschlagen (Goldhirsch et al. 2011). Es folgten weitere retrospektive Untersuchungen verschiedener Genexpressionsprofile mittels Microarray, z.B. MammaPrint (van't Veer et al. 2002; Wang et al. 2005; Knauer et al. 2010), oder qRT-PCR, z.B. durch den in den USA bereits zugelassene Test Oncotype DX (Paik et al. 2004; Paik et al. 2006). Dies ermöglicht eine Aussage über das Ansprechen des Tumors gegenüber einer chemotherapeutischen Behandlung und das Outcome der Patientinnen zu treffen (Lee 2005). Weitere prospektive Studien wurden bereits begonnen und werden nötig sein, um die Nutzung von Genexpressions-Tests zur Prädiktion weiter zu validieren und zu etablieren (Goncalves und Bose 2013). Die Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO) empfiehlt bisher keinen standardisierten Einsatz solcher Gentests bis weitere Studienergebnisse vorliegen, während sich der St. Gallen Konsensus für den Einsatz des Oncotype DX-Tests zur Einschätzung der Chemosensibilität bei rezeptorpositiven Patientinnen ausspricht (Gnant et al. 2011).

**Tabelle 1** Einteilung der intrinsischen Subtypen nach Goldhirsch et al. 2011

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| Luminal A                   | ER und/oder PR positiv<br>HER-2 negativ<br>Niedrige Expression von Ki-67                            |
| Luminal B<br>(Her2-negativ) | ER und/oder PR positiv<br>HER-2 negativ<br>Hohe Expression von Ki-67                                |
| Luminal B<br>(Her2-positiv) | ER und/oder PR positiv<br>HER-2 überexprimiert oder –amplifiziert<br>Beliebige Expression von Ki-67 |
| Erb-B2<br>Überexpression    | HER-2 positiv (Nicht-Luminal-Typ)<br>HER-2 überexprimiert oder -amplifiziert<br>ER und PR negativ   |
| “basal-like”                | Dreifach negativ (duktal)<br>HER-2 negativ<br>ER und PR negativ                                     |

## 1.2 Der Progesteronrezeptor und seine Spleißvarianten

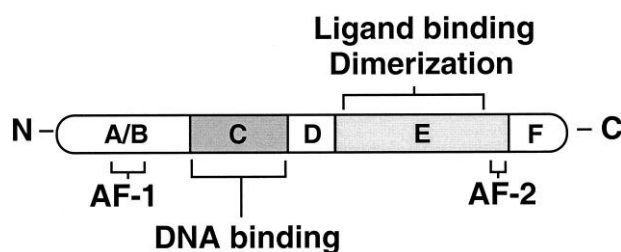
### 1.2.1 Aufbau

Über den Progesteronrezeptor und seinen mittels Wachstumsfaktor initiierten Signalübertragungsweg wird die epitheliale Proliferation im Zuge der Alveologenese in der Brustentwicklung angestoßen. Ebenso wirken Progesteronrezeptor-abhängige Signalwege bei der pathologischen Proliferation im Rahmen der Brustkrebsentstehung mit (Hagan et al. 2012).

Der Progesteronrezeptor gehört zur Gruppe der Steroidrezeptoren und damit zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren. Diese wirken als Transkriptionsfaktoren, die

durch die Bindung ihrer Liganden aktiviert werden (Kastner et al. 1990). Die Bindung der Liganden führt zu einer Konformationsänderung mit folgender Translokation des Rezeptors in den Nukleus, anschließender Dimerisation des Rezeptors und Interaktion mit spezifischen PREs (progesterone responsive elements) im Bereich der Promotorregion der DNA, einer spezifischen Nukleotidabfolge. Daneben sind auch PRE-unabhängige Effekte bekannt, zum Beispiel durch Interaktionen mit Co-Faktoren, die zu einer veränderten Genexpression führen (Li et al. 2004). Das Gen, welches für den Progesteronrezeptor kodiert, ist auf Chromosom 11q22-23 zu finden.

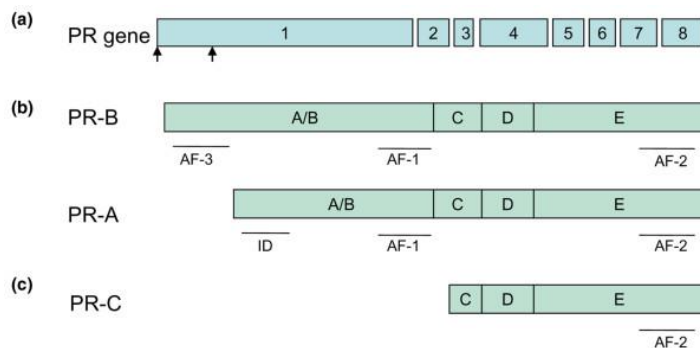
Das Gen besteht aus acht Exons, die jeweils für eine spezifische funktionelle Domäne des Rezeptors kodieren und sieben nicht-kodierenden Introns (Rousseau-Merck et al. 1987). Als nukleärer Rezeptor beinhaltet der Progesteronrezeptor eine DNA-Bindungsdomäne (DBD), die spezifische Neukleotidabfolgen der DNA erkennt, eine Liganden-Bindungsdomäne (LBD) für die Bindung der Steroidrezeptoren, eine Amino-Terminale-Domäne (NTD), die eine regulierende Wirkung aufweist, und eine Hinge-Region zwischen der DBD und LBD, welcher eine Rolle in der Dimerisierung und Ligandenbindung zukommt. Des Weiteren sind drei AFs (activation functions) mit regulierender Wirkung auf die Transkription von Genen vorhanden. AF1 innerhalb der NTD, AF2 innerhalb der LBD (Aranda und Pascual 2001) und AF3 im sogenannten „B-upstream segment“ (BUS) (Sartorius et al. 1994). Abbildung 1 zeigt die schematische Darstellung der beschriebenen Domänen eines nukleären Rezeptors. Die A/B-Region enthält hierbei die AF-1, Region C beinhaltet die DBD und Region D bildet die Verbindung zur E/F-Region, welche die LBD sowie AF-2 einschließt.



**Abbildung 1** Schematische Darstellung eines nukleären Rezeptors mit seinen verschiedenen Domänen. (Aranda und Pascual 2001).

### 1.2.2 PR-Isoformen

Das PR-Gen kodiert für die zwei Hauptisoformen des Progesteronrezeptors PR-A und PR-B, jedoch unter Verwendung unterschiedlicher östrogenabhängiger Promotoren innerhalb von Exon 1. PR-A entspricht dabei einer am N-Terminus um 164 Aminosäuren gekürzten Form von PR-B (Kastner et al. 1990). Diese für PR-B spezifische Region entspricht dem sogenannten „B-upstream segment“ (BUS), welches den dritten Aktivierungsfaktor „AF3“ enthält (Sartorius et al. 1994) und damit durch erhöhte Bindung von Co-Regulatoren die PR-B Isoform zu einem stärkeren Transkriptionsaktivator macht. Ebenso verdeckt das BUS eine inhibitorische Domäne (ID), welche zur Autoinhibition der PR-A Funktion genutzt wird (Giangrande et al. 1997). Neben diesen beiden Isoformen existiert eine weitere am N-Terminus gekürzte Form PR-C, welcher zusätzlich der erste Zinkfinder der DBD fehlt (Wei et al. 1990). Dadurch besteht zwar noch die Möglichkeit der Hormonbindung, jedoch nicht zur Bindung des PR-C an PRE's (Cork et al. 2008). Des Weiteren zeigen in vitro Studien, dass PR-C einen Einfluss auf die Aktivität der beiden anderen Isoformen hat (Wei et al. 1996). Abbildung 2 zeigt den schematischen Aufbau dieser PR-Isoformen.



**Abbildung 2** Schematische Darstellung des PR-Gens mit seinen Isoformen PR-A, PR-B und PR-C (Cork et al. 2008)

Im gesunden Brustgewebe findet man üblicherweise eine ähnlich hohe Expression der beiden Isoformen PR-A und PR-B. In manchen Brustkrebsgeweben besteht hingegen ein Ungleichgewicht dieser Expressionen, welches die Ansprechbarkeit gegenüber Progesteron zu beeinflussen (Graham et al. 1995) und eine Rolle für das Outcome nach

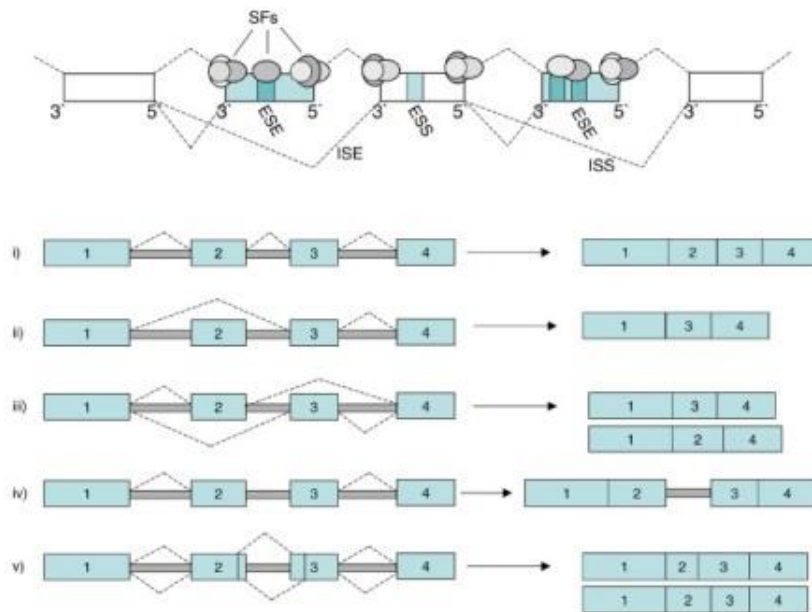
der Therapie zu spielen scheint. So konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte PR-A/PR-B Ratio mit einer vermehrten Rückfallquote nach der Behandlung mit Tamoxifen assoziiert ist (Hopp et al. 2004).

### **1.2.2 Alternatives Spleißen**

Bereits in den 1980er Jahren wurde der Prozess des alternativen Spleißens beschrieben, als herausgefunden wurde, dass membrangebundene und sezernierte Antikörper durch das gleiche Gen codiert werden (Alt et al. 1980). Eine bedeutende Entdeckung hierfür war ein Homologon des menschlichen „Dscam“ (down syndrome cell adhesion molecule)-Gens im Genom der *Drosophila melanogaster*, welches bis zu 38.016 verschiedene mRNA-Isoformen aufweist (Schmucker et al. 2000). Neuere Studien zeigen mittels Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierung, dass 95-100% der menschlichen prä-mRNAs Sequenzen enthalten, die für mehrere Exons kodieren und somit in verschiedene mRNAs umgeschrieben werden (Nilsen und Graveley 2010; Wang et al. 2008; Pan et al. 2008). Schätzungen zufolge werden damit 60% der menschlichen Gene durch alternatives Spleißen beeinflusst (Lander et al. 2001).

Der Aufbau der präkursorischen (prä-)mRNA lässt sich durch eine Abfolge von kodierenden Exons sowie nicht-kodierenden Introns beschreiben. Beim Spleißen werden die als Intron erkannten Abschnitte vom Spleißosom herausgeschnitten, wodurch die reife mRNA entsteht, welche zur Proteintranslation aus dem Zellkern geschleust wird. Alternatives Spleißen beschreibt das alternierende Entfernen oder Beibehalten von Intron- und Exonsequenzen beim Erstellen der mRNA und führt damit zu einer Vielfalt an Proteinen (Matlin et al. 2005; Nilsen und Graveley 2010).

Es gibt grundlegende Module, die beim alternativen Spleißen verwendet werden, welche in Abbildung 3 dargestellt sind. Gene, die nur für eine geringe Anzahl an mRNA-Isoformen kodieren, nutzen meist nur eines oder zwei dieser Module. Dazu zählen die Wahl einer alternativen 5'-Spleißseite, einer alternativen 3'-Spleißseite, Einschluss oder Ausschluss eines Kassettenexons und Einbehaltung von Introns (Nilsen und Graveley 2010).



**Abbildung 3 a)** Darstellung der präkursorischen mRNA mit ihren enthaltenen Exon- und Intron Enhancer Elements (ESE, ISE), welche die Nutzung verschiedener Spleißseiten fördern, sowie Exon- und Intron Silencer Elements (ESS, ISS), welche durch Bindung an bestimmte Proteine eine solche Nutzung inhibieren; des Weiteren sind Spleiß-Faktoren (SFs) dargestellt, die an regulatorische Elemente der mRNA binden. **3b)** Die verschiedenen Modelle des Alternativen Spleißens mit i) normalem Spleißen durch Entfernen der Introns 1,2 und 3; ii) Deletion eines kompletten Exons, hier Exon 2; iii) sich gegenseitig ausschließende Exons; entweder Exon 2 oder Exon 3 wird entfernt, jedoch treten niemals beide Exons zusammen auf; iv) Retention eines Introns, hier Intron 2; v) partielle Deletion von Exons durch kryptische Spleißstellen. (Cork et al. 2008)

Das klassische Spleißosom erkennt zwei Spleißseiten, einmal eine 5'Donor-Seite, die mit einem GU-Dinukleotid beginnt, und eine 3'Acceptor-Seite, die mit einem AG-Dinukleotid endet (Srebrow 2006). Es ist für die meisten Spleiß-Prozesse verantwortlich. Daneben gibt es eine zweite Art von Spleißosom, welches die Dinukleotide AU und AC als Spleißseiten wahrnimmt (Tarn und Steitz 1996).

Das Spleißosom besteht aus verschiedenen Untereinheiten, die unterschiedliche Abschnitte der prä-mRNA erkennen und untereinander sowie mit weiteren Proteinfaktoren interagieren können (Sharp 1997). Die Affinität der mRNA zum Spleißosom kann sich durch eine veränderte Nukleotidabfolge an der Spleißseite verändern. Darüber hinaus modulieren die sogenannten „Enhancer“ und „Silencer“ innerhalb der Exons oder Introns den Spleiß-Prozess, indem sie die Nutzung der veränderten Spleißseitensequenz durch regulierende Faktoren stimulieren oder



inhibieren. Viele Mutationen genetischer Erkrankungen zeigen einen solchen Effekt auf den Spleiß-Prozess, durch den es zu Veränderungen innerhalb der Proteinsynthese kommt (Srebrow 2006).

Zu den regulierenden Faktoren der Spleiß-Events zählen die SR-Proteine und hnRNPs (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins). Die SR-Proteine binden an spezifische Sequenzen der RNA, um den Spleiß-Mechanismus zu aktivieren und die Spleißosom-Untereinheiten anzulocken (Lin und Fu 2007). Die hnRNPs hingegen scheinen durch ihre RNA-Bindung und Interaktionen das Spleißen der RNA zu unterdrücken (Martinez-Contreras et al. 2007). Es agieren folglich einerseits die Enhancer und die SR-Proteine als Aktivatoren der Spleiß-Events sowie andererseits die Silencer und hnRNPs als Inhibitoren (Nilsen und Graveley 2010). Daneben bestehen viele weitere Faktoren, die einen Einfluss auf den Prozess des alternativen Spleißens haben. So ist zum Beispiel bekannt, dass die Chromatinstruktur der DNA eine große Dynamik aufweist und damit die Transkriptionsrate beeinflussen kann, was wiederum einen Einfluss auf die Modelle des Alternativen Spleißens zu haben scheint (Alló et al. 2009). Das alternative Spleißen beschreibt also einen sehr komplexen Prozess, der sich aus dem Zusammenspiel einer großen Anzahl von Faktoren zusammensetzt.

### **1.2.3 Spleißvarianten**

Das Vorkommen verschiedener Varianten durch alternatives Spleißen wurde auch in Bezug auf den Progesteronrezeptor untersucht. Hierbei konnten Varianten mit Beibehaltung von Intron-Sequenzen (Hirata et al. 2000, 2002b) nachgewiesen werden sowie Varianten mit Verlust eines oder mehreren Exons (Misao et al. 1998; Richer et al. 1998; Nagao et al. 2003; Springwald et al. 2010) oder auch nur einer Teilsequenz eines Exons (Balleine 1999; Hisatomi et al. 2003).

Ein neues vor Exon 4 lokalisiertes Exon S wurde beschrieben, welches im Spermatozoon sowie in endometrialem Gewebe entdeckt wurde. Es wird vermutet, dass Proteine, die durch diese erweiterte Sequenz entstehen, eine veränderte Länge des Carboxy-Terminus der Progesteronbindungsstelle und zudem einen Verlust der NTD und DNA-Bindungsdomäne aufweisen. Durch die enthaltene Progesteronbindungsstelle

dürfte die Möglichkeit zur Dimerisierung jedoch bestehen bleiben (Hirata et al. 2000). Ein zweites vor Exon 4 eingeschobenes Exon stellt Exon T dar. Da beide neuen Exons kein eigenes Startcodon besitzen und sich in ihrer Lokalisation entsprechen, kodieren sie vermutlich für die gleichen Proteine (Hirata et al. 2002b). In einer Studie konnten in endometrialem Karzinom- sowie Normalgewebe die sogenannten Exons i45a und i45b erfasst werden, die zwischen Exon 4 und Exon 5 eine zusätzliche 232bp lange Sequenz darstellen. Die abgeleiteten Proteine dürften die Domänen A und B, die DBD, die Hinge-Region, das NLS sowie 1/3 der aminoterminalen Bindungsdomäne und die zusätzlichen 13 Aminosäuren enthalten, während eine Leserahmenverschiebung zum Verlust der LBD führen würde (Yamanaka et al. 2002).

Alternative Spleißvarianten, die sich durch das Fehlen eines oder mehrerer Exons auszeichnen, wurden in einer größeren Zahl beobachtet. So zeigte sich der Verlust von Exon 2 als Variante PR $\Delta$ 2 in Brustkrebszellen, deren Protein den N-Terminus enthalten, aber nicht den ersten Zinkfinger der DBD. Durch Leserahmenverschiebung mit frühzeitigem Stopp-Codon käme es zum Verlust der LBD (Richer et al. 1998). Das Fehlen von Exon 3 (PR $\Delta$ 3) würde zum Fehlen des zweiten Zinkfingers der DBD führen (Cork et al. 2008). Exon 4 kodiert für die Hinge-Region des PR (Hill et al. 2012), so dass dessen Beseitigung in PR $\Delta$ 4 zu einem Protein ohne NLS und proximalen Teil der LBD führen würde (Richer et al. 1998). Das Protein von PR $\Delta$ 6 wäre im Zentrum der HBD gekürzt, ebenfalls im Rahmen eines frühzeitigen Stopp-Codons. Eine funktionelle LBD würde somit fehlen, die NLS und damit die Fähigkeit zur Dimerisierung und zur DNA-Bindung bliebe erhalten (Richer et al. 1998).

Die LBD würde man auch bei einem Protein des PR $\Delta$ 7 missen, während ebenfalls die NLS und DBD sowie AF-1 und AF-3 erhalten blieben und somit eine hormonunabhängige Aktivität des Rezeptors möglich wäre (Springwald et al. 2010). Neben diesen einfachen Deletionen von Exons, wurde auch das Fehlen mehrerer Exons in einigen PR-Varianten festgestellt. Diese PR-Varianten würden eine Kombination aus den oben beschriebenen Eigenschaften beinhalten.

So würde PR $\Delta$ 2+3 eine PBD und das NLS besitzen, während ein Teil der DBD fehle. Dieses Protein könnte also Progesteron binden, dimerisieren und in den Nukleus

gelangen (Cork et al. 2008). Weitere Varianten mit multiplen Exon-Deletionen sind PR $\Delta$ 3+4 (Misao et al. 2000), PR $\Delta$ 3+6 (Leygue et al. 1996), PR $\Delta$ 4+5 (Springwald et al. 2010), PR $\Delta$ 4+6 (Misao et al. 1998), PR $\Delta$ 5+6 (Leygue et al. 1996), PR $\Delta$ 6+7 (Springwald et al. 2010), PR $\Delta$ 3+4+5 (Springwald et al. 2010), PR $\Delta$ 4+5+6 (Misao et al. 1998) und PR $\Delta$ 3+4+5+6 (Misao et al. 2000).

Die DBD besteht aus Zinkfingern. Nur eine sehr begrenzte Zahl von Aminosäuren innerhalb der Gelenkregion der Zinkfinger ist entscheidend für die spezifische Erkennung von PREs (Kastner et al. 1990, S. 1603). Fehlt die DBD, ist das Protein zwar unfähig an die DNA zu binden und als Transkriptionsfaktor zu wirken, dennoch bleiben ihm aber durch die anderen Domänen Möglichkeiten zur Interaktion erhalten. Fehlt den Varianten hingegen die LBD, so besitzen sie dennoch die Fähigkeit an PREs der DNA zu binden (Bain 2001). Die Hinge-Region beinhaltet das NLS („nuclear location signal“) und ist damit für die Translokation in den Zellkern verantwortlich. Ist beim Fehlen der Hinge-Region jedoch die HBD intakt, so kann das Protein zum Beispiel durch Dimerisierung mit dem wild-type PR dennoch indirekt in den Nukleus gelangen und eine veränderte Rezeptorantwort hervorrufen (Richer et al. 1998). Die Varianten PR $\Delta$ 4, PR $\Delta$ 6 und PR $\Delta$ 5+6 werden in diesem Zusammenhang als dominant-negative Inhibitoren der Transkription von wild-type PRA und PRB beschrieben (Richer et al. 1998).

Darüber hinaus scheinen manche Varianten sehr speziell für bestimmte Gewebearten zu sein. So wird beispielsweise der PR $\Delta$ 3+6 bisher nur in Brustkrebsgewebe gefunden, jedoch nicht in endometrialem Gewebe (Misao et al. 1998). In gesundem Ovarialgewebe konnten bisher keine PR $\Delta$ 4+6 und PR $\Delta$ 4+5+6 Varianten nachgewiesen werden (Misao et al. 1998)

## 2. Fragestellung

Der Progesteronrezeptor hat sich mittlerweile zu einem starken prädiktiven Marker beim Mammakarzinom etabliert, da PR-positive Patientinnen eine bessere Ansprechrate auf eine endokrine Therapie zeigen (Osborne et al. 2005).

Cork et al. konnten zeigen, dass alternativ gespleißte mRNA des Progesteronrezeptors in als PR-negativ klassifiziertem Mammakarzinomgewebe zu finden ist und sich die Varianten in ihrer potenziellen Funktion Progesteron und DNA zu binden sowie mit einem nukleären PR-Cofaktor zu interagieren unterscheiden (Cork et al. 2012, S. 2329). Diskrepanzen zwischen dem ER/PR-Status und der Ansprechbarkeit auf eine Hormontherapie könnten auf der Präsenz solcher PR-Varianten beruhen (Cork et al. 2008), die mittels der derzeitig verwendeten Antikörper entweder nicht detektiert werden oder von den Isoformen des PR nicht zu unterscheiden sind (Hanley et al. 2009; Richer et al. 1998).

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der verschiedenen Spleißvarianten des Progesteronrezeptors für das Mammakarzinom eruiert. Hierzu wurde die Expression der verschiedenen Spleißvarianten mittels qRT-PCR ermittelt und die Proben auf das Vorliegen von sich wiederholenden Expressionsprofilen untersucht. Um einen Zusammenhang zwischen der Expression dieser Varianten und der prognostischen Bedeutung für die Mammakarzinom-Patientinnen zu analysieren, wurden die Expressionsdaten auf einen möglichen Zusammenhang mit wichtigen Prognosefaktoren sowie tumorbezogenen Markern (Bcl-2, STK-15, MYBL-2, Ki-67, Her-2-neu, PTEN und weitere ) geprüft. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zu zeigen, dass eine Genanalyse auf bestimmte Spleißvarianten, z.B. mittels Microarray, zu einer Optimierung der prognostischen und prädiktiven Aussagekraft des PR-Status führen könnte.

### 3. Materialien

Während den Untersuchungen wurden folgende in Tabelle 2 aufgeführten Materialien verwendet.

*Tabelle 2 Verwendete Materialien*

|                          | Reagenzien/Geräte  | Hersteller, Ort  |
|--------------------------|--|--|
| <b>cDNA Synthese</b>     | Random primer  | Invitrogen, Karlsruhe, D                                       |
|                          | M-MLV Reverse Transkriptase  | Promega, Mannheim, D   |
|                          | RNasin   | Promega, Mannheim, D   |
|                          | Ultra pure water   | Gibco, Invitrogen®, Carlsbad, USA                              |
|                          | MLV-Puffer   | Promega, Mannheim, D   |
|                          | dNTP-Mix   | Fermentas, St. Leon-Rot, D                                     |
|                          | MLV-Enzym  | Promega, Mannheim, D   |
|                          | Epicups 1,6ml  | Biozym scientific GmbH, Oldendorf, D                           |
|                          | Thermocycler T3  | Biometra, Göttingen, D   |
|                          | Zentrifuge Biofuge pico  | Heraeus SEPATECH, Hanau, D                                     |
| <b>Gelelektrophorese</b> | Loading puffer <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1% v/v Triton X</li> <li>- 0,01 M Tris (pH 7,5)</li> <li>- 5mM MgCl<sub>2</sub></li> <li>- 0,32 M Sucrose</li> </ul> | Calbiochem, San Diego, USA<br><br>Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D |
|                          | Biozym LE Agarose  | Biozym scientific GmbH, Oldendorf, D                           |

|                       |   |  |
|-----------------------|---|--|
|                       | 1-fach TBE-Puffer <ul style="list-style-type: none"> <li>- 100mM Tris</li> <li>- 83mM Borsäure</li> <li>- 1mM EDTA</li> </ul> | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D<br>Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D<br>Calbiochem, San Diego, USA |
|                       | Ethidiumbromid-Lösung 1%  | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D   |
|                       | 1kB Plus DNA ladder   | Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D  |
|                       | Elektrophorese-Gerät Horizon® 20·25<br><ul style="list-style-type: none"> <li>- Gelkammern</li> </ul>                         | GIBCO BRL, Life Technologies, Gaithersburg, USA<br>Armin Baack Labortechnik, Schwerin, D   |
|                       | UV-Transilluminator   | MWG Biotech AG, Ebersberg, D   |
|                       | Spannungsgerät PSP 304  | GIBCO BRL, Life Technologies, Gaithersburg, USA  |
|                       | Waage   | Sartorius AG, Göttingen, D   |
| <b>Gel-Extraction</b> | QIAquick Gel Extraction Kit   | Quiagen, Hilden, D   |
| <b>Real-time-PCR</b>  | LightCycler ® 2.0 Instrument  | Roche, Mannheim, D   |
|                       | LightCycler Software 4.0  | Roche, Mannheim, D   |
|                       | Primer for + rev  | Metabion international AG, Martinsried, D  |
|                       | LightCycler® FastStart DNA Master (PLUS) SYBR Green 1   | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D  |

|                   |                                     |   |
|-------------------|-------------------------------------|---|
|                   | LightCycler Capillaries             | Roche Diagnostics GmbH,<br>Mannheim, D                          |
|                   | PCR 8er Cap Strips 0,2ml            | Biozym scientific GmbH,<br>Oldendorf, D                         |
|                   | Pipetten                            | Eppendorf, Wesseling-<br>Berzdorf, D                            |
|                   | Biosphere ® Filterspitzen           | Sarstedt®, Nümbrecht, D   |
|                   | Flächendesinfektion Propanol<br>70% | B. Braun Melsungen AG,<br>Melsungen, D                          |
| <b>Geräte</b>     | MS2 Minishaker (Schüttelgerät)      | IKA – Werke GmbH & Co.<br>KG, Staufen, D                        |
|                   | Microzentrifuge                     | Qualitron Inc.  |
|                   | Werkbank HeraSafe                   | Kendro, Langenselbold, D  |
| <b>Zelllinien</b> | MCF-7, T47-D                        | ATCC® American Type<br>Culture Collection,<br>Manassas, VA, USA |

## 4. Methoden

### 4.1 Gewebe

Im Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Regensburg wurden 85 Mammakarzinom-Gewebeproben sowie 31 Normalgewebeproben als Gefrierschnitte präpariert und an die Arbeitsgruppe für molekulare Onkologie unter der Leitung von Herrn Dr. rer. nat. Oliver Treeck zur RNA-Isolation übergeben. Mitgeliefert wurden Patientendaten bezüglich Alter, Grading und Hormonrezeptorstatus.

### 4.2 cDNA-Synthese

Nach der RNA-Isolation aus den bereitgestellten Mammakarzinom-Proben erfolgte zur weiteren Untersuchung die cDNA-Synthese. Hierbei wird mittels dem Enzym Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, ein dem vorhandenen RNA-Strang komplementärer DNA-Strang hybridisiert. Anschließend kann dieser Hybridstrang durch den Ribonuklease-Anteil hydrolysiert und im nächsten Schritt ein komplementärer DNA-Strang generiert werden, sodass schließlich eine doppelsträngige cDNA entsteht (Graw 2010).

Für die cDNA-Synthese wurde 1µl eines Mastermix A, bestehend aus 0,8µl random Primer Oligonucleotide (100ng/µl) und 0,2 µl RNAsin® Plus RNase-Inhibitor, hergestellt. Für den einfachen cDNA-Synthese-Ansatz wurden 4,6 µl RNase-freies H<sub>2</sub>O vorgelegt und 1µl Mastermix A sowie 0,5µl RNA hinzupipettiert. Nach Mischen und anschließender Zentrifugation erfolgte die Inkubation im Thermocycler bei einer Temperatur von 70°C für 5 Minuten und anschließend die Kühlung bei 4°C für weitere 5 Minuten. Durch diese Schritte erfolgte die Hybridisierung einer Startsequenz an die mRNA-Moleküle.

Nun wurden 4,4µl eines zweiten Mastermix B, bestehend aus 2µl MLV-Puffer, 1µl 10mM dNTP-Mix, 0,2µl M-MLV RT RNase und 1,7µl RNase-freiem Wasser, angesetzt und dem Ansatz nach erfolgter Inkubation zugegeben, mit ihm vermischt und zentrifugiert.



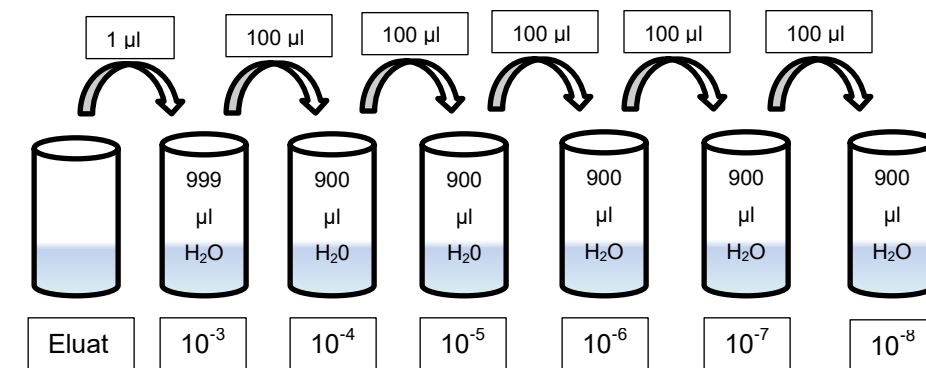
Anschließend wurde der Ansatz der reversen Transkription unterzogen. Es erfolgte eine Inkubation bei 25°C für 10min, 48°C für 50min und 70°C für 15min. Hiernach fand eine fortlaufende Kühlung der cDNA bei 4°C statt. Die entstandene cDNA wurde im Verhältnis 1:5 mit H<sub>2</sub>O verdünnt, abzentrifugiert und in EpiCups bei minus 20°C eingefroren.

### 4.3 Herstellung spezifischer Kalibratoren

Zur Beurteilung der später durch real time-PCR entstandenen Schmelzkurven wurden im Vorfeld spezifische Kalibratoren ausgewählt, die als Positivkontrolle dienten. Diese garantierten in den folgenden Untersuchungen eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse.

Hierzu wurde eine real time-PCR nach bekanntem Schema (siehe Kapitel 4.5) zur Analyse der verschiedenen Progesteronrezeptor-Varianten in zwei Zelllinien, MCF-7 und T47-D, in jeweils doppeltem Ansatz durchgeführt, um anschließend die Proben mit positiver Schmelzkurve in einer Gelelektrophorese (siehe Kapitel 4.4 „Gelelektrophorese“) aufzutrennen und die Fragmentgröße (vgl. Tabelle 6, Kapitel 4.5) zu überprüfen.

Mittels QUIAquick Gel Extraction Kit Protocol (Kapitel 4.4.1) wurden die ausgewählten Proben erneut aus dem Gel eluiert und nun zur Herstellung von Verdünnungsreihen im Spektrum von  $10^{-3}$  bis  $10^{-8}$  nach folgendem Schema verwendet (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4** Erstellen der Verdünnungsreihe zur Herstellung spezifischer Kalibratoren.

Mittels real time-PCR wurde nun im jeweiligen Doppelansatz der gewählten Verdünnungen und mit H<sub>2</sub>O enthaltender Negativkontrolle eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt und für jede Progesteronrezeptor-Variante der geeignete Kalibrator herausgesucht. Durch wiederholtes Auftragen der ausgewählten Eluate im Gel wurden erneut die richtigen Fragmentgrößen überprüft. Es resultierten die in Tabelle 3 aufgelisteten spezifische Kalibratoren, welche nun in EpiCups aliquotiert und bei minus 20°C eingefroren werden konnten.

**Tabelle 3** Auswahl der spezifischen Kalibratoren und deren Ct-Wert

| <b>Zielgen,<br/>laufende Nr.</b> | <b>PR-Variante</b> | <b>CT-Wert<br/>Kalibrator</b> |
|----------------------------------|--------------------|-------------------------------|
| 1B                               | $\Delta 2$         | 25,96                         |
| 2A                               | $\Delta 3$         | 27,50                         |
| 4A                               | $\Delta 5$         | 23,59                         |
| 5A                               | $\Delta 6$         | 28,65                         |
| 6A                               | $\Delta 7$         | 25,47                         |
| 7A                               | Exon T             | 19,31                         |
| 8A                               | Exon S             | 19,21                         |
| 9B                               | Exon a (i45a)      | 28,07                         |
| 10A                              | Exon b (i45b)      | 21,85                         |
| 11A                              | $\Delta 2/3$       | 31,14                         |
| 12B                              | $\Delta 3/4$       | 30,38                         |
| 13A                              | $\Delta 4/5$       | 27,58                         |
| 14B                              | $\Delta 5/6$       | 27,25                         |
| 15A                              | $\Delta 6/7$       | 28,01                         |
| 17A                              | $\Delta 3/4/5$     | 26,17                         |
| 18B                              | $\Delta 4/5/6$     | 26,00                         |
| 19B                              | $\Delta 3/4/5/6$   | 25,96                         |
| PR-B                             | PR-B               | 24,73                         |
| PR-AB                            | PR-AB              | 26,2                          |
| PR-ABC                           | PR-ABC             | 26,59                         |

#### 4.4 Gelelektrophorese

Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese ist es möglich, DNA-Stränge ihrer Größe nach aufzutrennen und durch Vergleich mit dem DNA-Längenstandard die Anzahl der vorhandenen Basenpaare zu bestimmen. Die Konzentration des Agarosegels wird anhand der zu erwartenden Fragmentgrößen gewählt. Durch Anlegen eines Spannungsfeldes und Einlegen des Gels in eine ionische Pufferlösung wandern die Nukleinsäurestränge entlang des Gels. Dies lässt sich durch die negativ geladenen Phosphatgruppen am Rückgrat der DNA erklären, welche für die Wanderung in Richtung positiv geladener Anode im Spannungsfeld verantwortlich sind. Kleine Moleküle wandern schneller durch das porige Netz des Agarosegels als größere Moleküle. Durch Zusatz eines fluoreszierenden Stoffes wie Ethidiumbromid, welches in die Nukleinsäurestränge eingelagert wird, können im Anschluss die Nukleinsäuren unter Einfluss von UV-Licht als Banden sichtbar gemacht und durch eine Fotoaufnahme (siehe Abbildung 5) dokumentiert werden (Jansohn 2006).

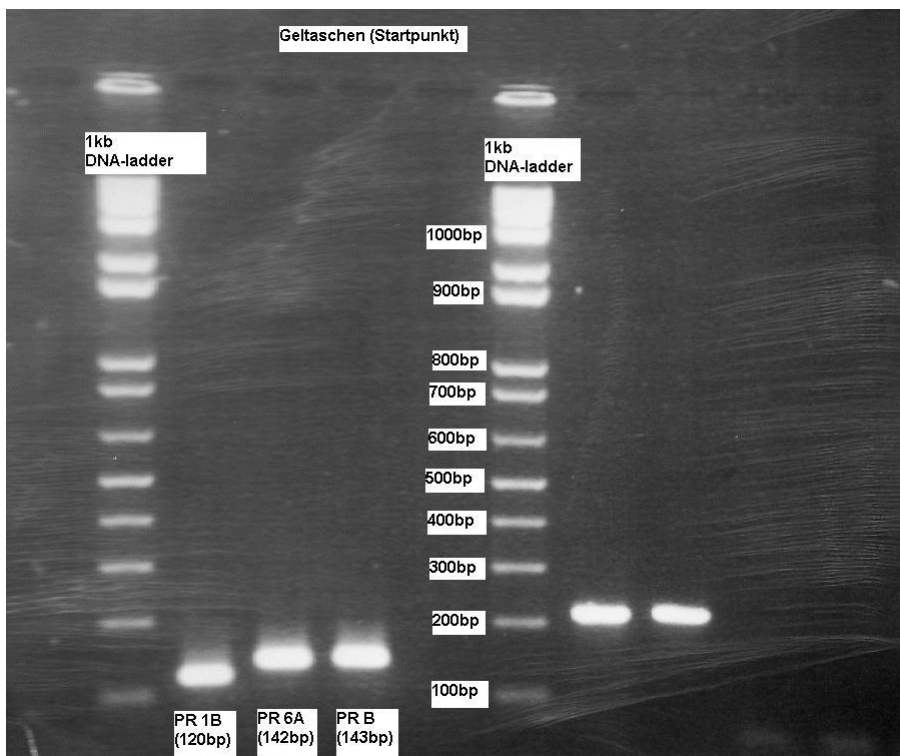


Abbildung 5 Beispiel einer Gelelektrophorese

Für diese Arbeit wurde ein 1,5%iges Agarosegel hergestellt. Hierzu wurden 2,7g Agarose mit 1-fach TBE-Puffer (100mM Tris, 83mM Borsäure, 1mM EDTA) auf ein Gewicht von 180g aufgefüllt. In der Mikrowelle wurde das Gemisch zum Kochen gebracht, um die Agarose aufzulösen. Anschließend wurde die Agarose unter ständigem Schwenken unterm Wasserstrahl abgekühlt und die verdunstete Menge mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Für die spätere UV-Belichtung wurden nun 9 µl Ethidiumbromid zugegeben. Danach wurde das flüssige Agarosegel blasenfrei in den Gelkasten eingefüllt, die Gelkämme eingesteckt und der Gelkasten zum Festwerden der Masse für ca. 20min im Kühlschrank abgekühlt. Anschließend konnten die Gelkämme entfernt und der Gelkasten in das mit 1-fach TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresebett gelegt werden. Nun mussten zunächst die Kapillaren vom Light-Cycler-Set in einen Eppendorfcup abzentrifugiert und je 10 µl Probe 2µl Loading Puffer hinzugefügt werden. Daraufhin wurden die mit Loadingpuffer versetzten Proben sowie der 1kB-Größenstandard nach einem zuvor festgelegtem Schema in die Geltaschen einpipettiert und eine Gleichstromspannung von 150mA/200V angelegt. Nach ca. 90 Minuten konnte der Gelträger aus dem Elektrophoresebett genommen und die Banden unter einem UV-Transluminator sichtbar gemacht und mittels Fotoaufnahme dokumentiert werden. Anhand es 1kB-Größenstandards konnten nun die gewanderten Nukleinsäuren-Molekülgrößen abgeschätzt und mit den bekannten Fragmentgrößen (siehe Tabelle 6) verglichen werden.

Um Proben, die in einem Agarosegel aufgetragen wurden, für weitere Untersuchungen nutzen zu können, mussten diese aus dem Gel eluiert werden. Hierzu wurden mittels eines sauberen Skalpells die unter UV-Licht sichtbaren DNA-Fragmente aus dem Gel geschnitten und in ein Eppendorfcup überführt. Durch Abwiegen der Eppendorfcups wurde das Volumen des Gelfragments bestimmt und das dreifache Volumen an Puffer QG (100mg entsprechen 100µl) hinzugefügt. Unter ständiger Inkubation bei 50°C wurde die Probe alle 2-3 min auf dem Vortexer gemischt. Nach Auflösen des Gelfragments musste der pH-Wert der Probe gegebenenfalls mithilfe von 10µl 3M Natriumacetat auf einen pH-Wert von 5,0 eingestellt werden (sichtbare gelbe Farbe der Probe). Nun wurden der Probe eine Gelvolumeneinheit Isopropanol zugesetzt und mit dieser vermischt. Nach Pipettieren der Probe auf die Säule und Zentrifugation der Probe für 1

min wurden 500 µl QG-Puffer hinzugefügt und die Zentrifugation für 1 min fortgeführt. Durch Zugabe von 750 µl Puffer PE und dem Ruhen der Säule für 5 min bei Raumtemperatur mit anschließender Zentrifugation für 1min, wurde die Probe gewaschen. Nun konnte der Überstand verworfen und die Säule nach erneuter Zentrifugation in ein neues Eppendorfcup überführt werden. Danach erfolgte die Elution der DNA in 30 µl H<sub>2</sub>O mit folgender Ruhe für 1min und abschließender Zentrifugation. Die Elution wurde ein zweites Mal wiederholt.

#### **4.5 Real time-PCR und Schmelzkurvenanalyse**

Die real time-PCR setzt sich aus drei Phasen zusammen. Diese sind die Denaturierungs-, die Annealing- und die Elongationsphase. In der Denaturierungsphase erfolgt die Erhitzung des Reaktionsgemisches. Die doppelsträngige DNA wird dadurch in zwei Einzelstränge aufgetrennt, da die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen werden. In der Annealing-Phase lagern sich die Primer an den DNA-Strängen an. Hierzu muss eine charakterisierende Temperatur gewählt werden, die sich nach Länge und Sequenz des Primers richtet, da es ansonsten zur Anlagerung an nicht-komplementäre Sequenzen oder zu einer ineffizienten Hybridisierung kommen kann.

Am Ende steht die Elongationsphase. Hier werden die komplementären DNA-Stränge durch Anlagerung und Verbindung der jeweiligen Nukleotide mithilfe der DNA-Polymerase verlängert. Dieser Schritt erfolgt bei einer Temperatur, die dem Arbeitsoptimum der DNA-Polymerase entspricht. Die somit neu entstandene DNA wird in den weiteren Zyklen als Matrize für weitere Amplifikationen genutzt, sodass es zu einem exponentiellen Anstieg der Vervielfältigungskopien kommt.

Mithilfe der PCR ist es möglich, zusätzlich zu dieser gezielten Amplifikation von Nukleinsäuren, eine quantitative Auswertung der Vervielfältigungskopien zu erhalten. Dies wird durch den Einsatz fluoreszierender Sonden erreicht, in der vorliegenden Arbeit mittels SYBR-Green I. Die Farbstoffe lagern sich an die doppelsträngige DNA an, d.h. durch die Vervielfältigung der spezifischen Nukleinsäure steigt auch die Fluoreszenz in der Messung an, welche anhand der im Computersystem dargestellten

Fluoreszenzkurven sichtbar wird. Diese Messung erfolgt jeweils am Ende der Elongation jedes einzelnen PCR-Zyklus (Jansohn 2006).

Neben den zu untersuchenden Proben wurde in dieser Arbeit eine Kapillare mit H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle in den LightCycler-Lauf integriert, sodass eine Verunreinigung des Mastermix weitgehend ausgeschlossen werden konnte. Des Weiteren wurde die Fluoreszenz des spezifischen Kalibrators in doppeltem Ansatz gemessen, um eine Eichkurve für die zu untersuchende Spleißvariante zu erhalten. Anhand dieser konnte dann der zu erwartende Ct-Wert („cycle threshold“) der Spleißvariante eingestellt werden, welcher demjenigen Punkt der Kurve entspricht, an dem die Fluoreszenz der Probe erstmals die Hintergrundfluoreszenz exponentiell übersteigt. Je mehr Nukleinsäuren vor der Amplifikation vorliegen, desto schneller wird dieser Schwellenwert erreicht. Die Ct-Werte der untersuchten Mammakarzinom-Proben wurden nun zum gleichen Zeitpunkt abgelesen und in eine angelegte Excel-Tabelle übertragen.

In dieser Arbeit wurden pro LightCycler-Lauf 45 Zyklen gemäß Tabelle 4 durchgeführt:

*Tabelle 4* Einstellung des LightCycler-Programms nach den einzelnen PCR-Phasen.

| PCR-Phase                     | Temperatur | Zeit  |
|-------------------------------|------------|-------|
| <b>Initiale Denaturierung</b> | 95°C       | 15min |
| <b>Cycle-Denaturierung</b>    | 95°C       | 10sec |
| <b>Annealing</b>              | 60°C       | 5sec  |
| <b>Elongation</b>             | 72°C       | 12sec |

**Vorbereiten der Kapillaren zur real time-PCR:**

Die folgenden Reagenzien wurden aus dem LightCycler Kit von Roche verwendet, die Pipettievorgänge wurden im Cooling-Block des LightCyclers durchgeführt. Für den Mastermix wurden zunächst 10µl Fast-Start Enzym zu einem Gefäß Fast-Start Reaction Mix pipettiert, um das sogenannte „Fast-Start DNA Master SYBR Green 10 X conc.“ zu erhalten. Anschließend konnte die Mischung im Kühlschrank bei 2-8°C lichtgeschützt für maximal 1 Woche aufbewahrt und so für mehrere LightCycler-Läufe verwendet werden.

Der Mastermix setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

3,4 µl H<sub>2</sub>O

0,6 µl MgCl<sub>2</sub> stock solution

0,5 µl Primer forward (10 µM)

0,5 µl Primer reverse ( 10 µM)

1 µl Fast-Start DNA Master SYBR Green 10 X conc.

Nach dem Befüllen der Kapillaren mit 6 µl Mastermix wurden diese mit 4 µl der zu untersuchenden cDNA-Probe bzw. des spezifischen Kalibrators (Tabelle 3) versetzt. Jedem Lauf wurde eine Negativkontrolle, bestehend aus 6 µl Mastermix und 4 µl H<sub>2</sub>O, beigelegt. Die Kapillaren wurden mit dem dazugehörigen Plastikdeckel verschlossen und anschließend zentrifugiert, bevor sie in die Haltevorrichtung des LightCyclers eingesetzt wurden. Die Pipettievorgänge wurden an einem mit Abzug und Schutzscheibe ausgestatteten Arbeitsplatz durchgeführt. Tabelle 5 zeigt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primer.

**Tabelle 5** Übersicht der verwendeten Primer für die PR-Varianten.

| laufende Nr. | Variante         | Primername | Primer forward/ reverse     |
|--------------|------------------|------------|-----------------------------|
| 1B           | $\Delta 2$       | PR 1B_for  | GCGCTCTACCCTGCACTC          |
|              |                  | PR 1B_rev  | TTGTGCTGCCCTCAGGTAGT        |
| 2A           | $\Delta 3$       | PR 2A_for  | GGCAATGGAAGGTCGAAAAT        |
|              |                  | PR 2A_rev  | TAGGGCTTGGCTTTTCATTTG       |
| 4A           | $\Delta 5$       | PR 4A_for  | ATTGCCAGACAGCGGATG          |
|              |                  | PR 4A_rev  | GGAACTCTTCTTGGCTAACTTGA     |
| 5A           | $\Delta 6$       | PR 5A_for  | GATCTAATACTAAATGATTCCTTTGGA |
|              |                  | PR 5A_rev  | TGTAAGTTGATAGAAACGCTGTGA    |
| 6A           | $\Delta 7$       | PR 6A_for  | CTTCTTAATACAACCTTGTCAAACAAC |
|              |                  | PR 6A_rev  | CACCATCCCTGCCAATATCT        |
| 7A           | Exon T           | PR 7A_for  | CGGCACGTATAGGTCGAAAAT       |
|              |                  | PR 7A_rev  | TAGGGCTTGGCTTTTCATTTG       |
| 8A           | Exon S           | PR 8A_for  | ACACAGGAGGGGTCGAAAAT        |
|              |                  | PR 8A_rev  | TAGGGCTTGGCTTTTCATTTG       |
| 9B           | Exon a           | PR 9B_for  | TGCAGGACATGACAACACAA        |
|              |                  | PR 9B_rev  | CAGTTTCCTGGCAATGATTT        |
| 10A          | Exon b           | PR 10A_for | GGGAAAGTAGGAAGGTTTTCG       |
|              |                  | PR 10A_rev | TACAGCATCTGCCCACTGAC        |
| 11A          | $\Delta 2/3$     | PR 11A_for | TCAACTACCTGAGGTCGAAAAT      |
|              |                  | PR 11A_rev | TAGGGCTTGGCTTTTCATTTG       |
| 12B          | $\Delta 3/4$     | PR 12B_for | GATTCAGAAGCCAGCCAGAG        |
|              |                  | PR 12B_rev | TTTCGAAAACCTTCCATTGC        |
| 13A          | $\Delta 4/5$     | PR 13A_for | TCCTTGGAGACAGCGGATG         |
|              |                  | PR 13A_rev | GGAACTCTTCTTGGCTAACTTGA     |
| 14B          | $\Delta 5/6$     | PR 14B_for | TGCAGGACATGACAACACAA        |
|              |                  | PR 14B_rev | TCCAAAGGAACTGGCAATGA        |
| 15A          | $\Delta 6/7$     | PR 15A_for | ATACTAAATGACTTGTCAAACAACTTC |
|              |                  | PR 15A_rev | CACCATCCCTGCCAATATCT        |
| 17A          | $\Delta 3/4/5$   | PR 17A_for | CAATGGAAGACAGCGGATG         |
|              |                  | PR 17A_rev | GGAACTCTTCTTGGCTAACTTGA     |
| 18B          | $\Delta 4/5/6$   | PR 18B_for | TGGAAGAAATGACTGCATCG        |
|              |                  | PR 18B_rev | TCCAAAGGAACTCCAAGGAC        |
| 19B          | $\Delta 3/4/5/6$ | PR 19B_for | GATTCAGAAGCCAGCCAGA         |
|              |                  | PR 19B_rev | AGGAACTTCCATTGCCCTCT        |



|        |        |              |                         |
|--------|--------|--------------|-------------------------|
| PR-B   | PR-B   | PR-B_for     | GTACGGAGCCAGCAGAAGTC    |
|        |        | PR-B_rev     | TCTCTGGCATCAAACCTCGTG   |
| PR-AB  | PR-AB  | PR-A/B_for   | ACACCTTGCCTGAAGTTTCG    |
|        |        | PR-A/B_rev   | CTGGGGGACTAGAACTGCTG    |
| PR-ABC | PR-ABC | PR-A/B/C_for | CAACTACCTGAGGCCGGATT    |
|        |        | PR-A/B/C_rev | CATTGCCCTCTTAAAGAAGACCT |

### Schmelzkurvenanalyse:

Jede doppelsträngige DNA besitzt eine spezifische Schmelztemperatur, ab der sie sich in zwei Einzelstränge auftrennt. Ab dem Erreichen dieser Schmelztemperatur nimmt folglich die gemessene Fluoreszenz der Probe wieder ab, da der Farbstoff freigegeben wird und somit nicht mehr fluoresziert. Das LightCycler-Programm errechnet die dazugehörige negative erste Ableitung und es ergibt sich die spezifische Schmelzkurve (Jansohn 2006). Da die zu erwartenden Schmelztemperaturen für die einzelnen DNA-Fragmente bekannt sind (siehe Tabelle 6), kann mithilfe der Schmelzkurvenanalyse die Spezifität des Versuches erhöht werden. In dieser Arbeit wurde zu jeder untersuchten Probe eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt und diese in Kategorien eingeteilt. Die erste Kategorie umfasst die „positiven“ Schmelzkurven, bei denen sich der Peak direkt bei der zu erwartenden Schmelztemperatur befindet. Schmelzkurven ohne Peak oder mit einem Ausschlag bei abweichender Schmelztemperatur wurden in die Kategorie „negativ“ eingeteilt, da nicht davon ausgegangen werden kann, dass es sich um das gesuchte Zielgen handelt. Die Schmelzkurve des Kalibrators diene hierbei als Vergleichskurve.

Tabelle 6 Untersuchte Varianten mit zugehöriger Fragmentgröße und spezifischer Schmelztemperatur.

| laufende Nr. | Variante         | Fragmentgröße [bp] | Peak [°C] |
|--------------|------------------|--------------------|-----------|
| 1B           | $\Delta 2$       | 120                | 92,8      |
| 2A           | $\Delta 3$       | 112                | 85,8      |
| 4A           | $\Delta 5$       | 106                | 81,7      |
| 5A           | $\Delta 6$       | 151                | 84        |
| 6A           | $\Delta 7$       | 142                | 82        |
| 7A           | Exon T           | 113                | 86        |
| 8A           | Exon S           | 112                | 85,8      |
| 9B           | Exon a           | 120                | 83        |
| 10A          | Exon b           | 132                | 81        |
| 11A          | $\Delta 2/3$     | 114                | 86        |
| 12B          | $\Delta 3/4$     | 158                | 84        |
| 13A          | $\Delta 4/5$     | 107                | 82        |
| 14B          | $\Delta 5/6$     | 123                | 83,5      |
| 15A          | $\Delta 6/7$     | 140                | 81,8      |
| 17A          | $\Delta 3/4/5$   | 107                | 81,5      |
| 18B          | $\Delta 4/5/6$   | 105                | 84        |
| 19B          | $\Delta 3/4/5/6$ | 153                | 84        |
| PR-B         | PR-B             | 143                | 84        |
| PR-AB        | PR-AB            | 186                | 90,8      |
| PR-ABC       | PR-ABC           | 160                | 84,2      |

### Kontrolle der Amplifikatsprodukte:

Konnte eine Schmelzkurve nicht sicher beurteilt werden, wurde die Fragmentgröße der Probe mittels Agarosegelelektrophorese (Kapitel 4.4) nachgewiesen. So konnte festgestellt werden, ob es sich bei dem Amplifikationsprodukt um die gewünschte Spleißvariante handelte und die Einteilung richtig erfolgte.

### Houskeeping-Gen Betaactin:

Um einen Vergleich der Ct-Werte durch eine relative Quantifizierung zu ermöglichen, wurde in dieser Arbeit Betaactin als Referenzgen eingesetzt. Betaactin ist als Housekeeping Gen bekannt und zeichnet sich durch eine stabile Expression in Zellen

aus, unabhängig von äußeren regulatorischen Einflüssen, Zellzyklus und Zelltyp. Durch den Einsatz einer solchen endogenen Kontrolle kann eine mögliche Variation innerhalb der eingesetzten DNA-Ausgangsmengen ausgeglichen werden (Pfaffl 2004). Jeweils zwei LightCycler-Läufe wurden mit Betaactin durchgeführt und zur weiteren Auswertung die Mittelwerte der gemessenen Expressionen verwendet.

#### 4.6 Marker

In die spätere Auswertung wurden die Expressionsdaten von 16 verschiedenen Markern miteinbezogen. Die folgenden Tabellen zeigen die hierfür verwendeten Primer.

*Tabelle 7 Primerbezeichnung und zugehörige Primersequenz der einzelnen Marker.*

| Marker              | Primername       | Primer forward/ reverse        |
|---------------------|------------------|--------------------------------|
| <b>Bcl2</b>         | Bcl2_for         | GGAGGCTGGGATGCCTTT             |
|                     | Bcl2_rev         | CCAGGGTGATGCAAGCTC             |
| <b>STK15</b>        | STK15_for        | CCACCTTCGGCATCCTAAT            |
|                     | STK15_rev        | GCAGTTCTCTGCTCATCAAATT         |
| <b>MYBL2</b>        | MYBL2_for        | GGAAGACCAAAAAGTCATCGAG         |
|                     | MYBL2_rev        | CTCAGGGTTGAGGTGGTTGT           |
| <b>Cathepsin-L2</b> | Cathepsin-L2_for | TGGTGACATGACCAATGAAG           |
|                     | Cathepsin-L2_rev | GCGTCACGTAGCCTTTCTTT           |
| <b>Stromelysin</b>  | Stromelysin_for  | GATGACCAGGGCACAGACCT           |
|                     | Stromelysin_rev  | ACTCAGTGGGTAGCGAAAGG           |
| <b>Ki-67</b>        | Ki-67_for        | CAGTTCCACAAATCCAACACA          |
|                     | Ki-67_rev        | CTTTCATTTTCATACCTGAAGGAAC      |
| <b>Cyclin-B1</b>    | Cyclin B1_for    | GACAACTTGAGGAAGAGCAAGC         |
|                     | Cyclin B1_rev    | ATGGTCTCCTGCAACAACCT           |
| <b>HER2neu</b>      | HER2/neu_for     | CATGGTCAAATGTTGGATGATT         |
|                     | HER2/neu_rev     | CCTCATTCTGGATGACCACA           |
| <b>p21/WAF</b>      | WAF_for          | GCA TGA CAG ATT TCT ACC ACT CC |
|                     | WAF_rev          | AAG ATG TAG AGC GGG CCT TT     |
| <b>GRB7</b>         | GRB7_for         | AAGACCTCATCCAGAACTTCCT         |
|                     | GRB7_rev         | AGCAGAAAAAGCGTTTCCAA           |
| <b>CD68</b>         | CD68_for         | TTTGGGCAAAGTTTCTCCTG           |
|                     | CD68_rev         | GCAGAAAGCAATAAGCACCA           |
| <b>BAG1</b>         | BAG1_for         | TGGGAAAAAGAACAGTCCAC           |

|                   |                |                           |
|-------------------|----------------|---------------------------|
|                   | BAG1_rev       | TGGATTCCAGTAAGCTCTTTATTCA |
| <b>SCUBE2</b>     | SCUBE2_for     | CTCGGAAGAGGGCCTGA         |
|                   | SCUBE2_rev     | TGCAGTCTCTCTGGTTCTTGG     |
| <b>E-Cadherin</b> | E-Cadherin_for | GCCACATACACTCTCTTCTCTCAC  |
|                   | E-Cadherin_rev | AGCACCTTCCATGACAGACC      |
| <b>PTEN</b>       | PTEN_for       | CCAGAGACAAAAAGGGAGTAACTA  |
|                   | PTEN_rev       | TCACCTTTAGCTGGCAGACC      |
| <b>GSTM1</b>      | GSTM1_for      | CACAACCTGTGTGGGGAGAC      |
|                   | GSTM1_rev      | AAATTCTGGATTGTAGCAGATCA   |

#### 4.7 Auswertung und Statistik

##### **Δ CT – Methode (nach Livak und Schmittgen, 2001):**

Die relative Quantifizierung wurde in dieser Arbeit mit dem Referenzgen Betaactin durchgeführt. Zur Normierung der Expressionsunterschiede wurden im Ersten Schritt entsprechend unten aufgeführter Formel die Ct-Werte des Referenzgens von den jeweiligen Ct-Werten des zu untersuchenden Gens innerhalb eines Templates abgezogen.

$$\Delta CT = \text{Ct-Wert}_{\text{Zielgen}} - \text{Ct-Wert}_{\text{Referenzgen}}$$

Im Zweiten Schritt erfolgte die Berechnung der Ratio, d.h. der relativen Expressionsunterschiede, mittels **Ratio =  $2^{-\Delta CT}$** . Anschließend wurde die Ratio zur besseren Veranschaulichung der Werte mit dem Wert 1000 multipliziert.

In den folgenden Statistikberechnungen wurde stets der sogenannte R-Wert mit

$$R = 2^{-\Delta CT} \times 1000 \text{ Werte verwendet (Pfaffl 2004).}$$

**Statistik:**

Zur statistischen Analyse der Daten wurde das Programm *PASW Statistics 18* verwendet. Mit diesem wurde die Korrelation der Expressionen zwischen den Varianten und dem panPR, den Varianten und den Markergenen sowie den Varianten und der panER $\alpha$ -Expression untersucht. Für diese Korrelation wurde der Spearman-Roh-Korrelationskoeffizient berechnet. Dieser Test zählt zu den nichtparametrischen Korrelationsanalysen, die durch Zuordnung von Rangplätzen innerhalb von zwei Testgruppen die Stärke eines Zusammenhanges testet. Der Korrelationskoeffizient Spearmans rho (rs) kann dabei Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Der Wert +/-1 verdeutlicht dabei einen sehr starken Zusammenhang, während Werte gegen 0 eine immer geringere Korrelation ausdrücken.

Durch einen folgenden Test auf Signifikanz konnte ein statistischer Zusammenhang untersucht werden. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0.05$  festgelegt.

Mithilfe des Wilcoxon Tests für verbundene Stichproben wurden die sogenannten „Matched Pairs“ miteinander korreliert. Hierbei wurden die Expressionsdaten der Spleißvarianten innerhalb des Karzinomgewebes sowie des von derselben Patientin gewonnenen Normalgewebes miteinander verglichen. In dieser Arbeit wurden 27 solcher Paare untersucht. Der Wilcoxon Test berechnet die zentrale Tendenz der vorliegenden Paardifferenzen und zeigt damit an, ob es einen signifikanten Unterschied in ihrer Verteilung gibt. Es folgt eine automatische Testung auf Signifikanz durch SPSS mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0.05$ .

Innerhalb Microsoft Excel 2010 wurde der studentische T-Test zur Untersuchung der Subgruppen für jede Variante angewandt. Hierdurch konnten die Gruppen auf signifikante Mittelwertunterschiede untersucht werden. Auch hier wurde eine Signifikanz bei  $p < 0.05$  angenommen.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Expressionsprofile der Spleißvarianten

Im Verlauf dieser Arbeit wurde zunächst mittels real time-PCR die Expression 17 verschiedener Progesteronrezeptor-Spleißvarianten und der Progesteronrezeptor-Isoformen innerhalb von 85 Mammakarzinom-Proben sowie 31 Proben aus normalem Brustgewebe untersucht. Die Mammakarzinom-Proben lassen sich in die drei Subgruppen G1 ER $\alpha$  positiv, G3 ER $\alpha$  negativ und G3 ER $\alpha$  positiv unterteilen. Tabelle 8 zeigt die untersuchten Progesteronrezeptor-Spleißvarianten.

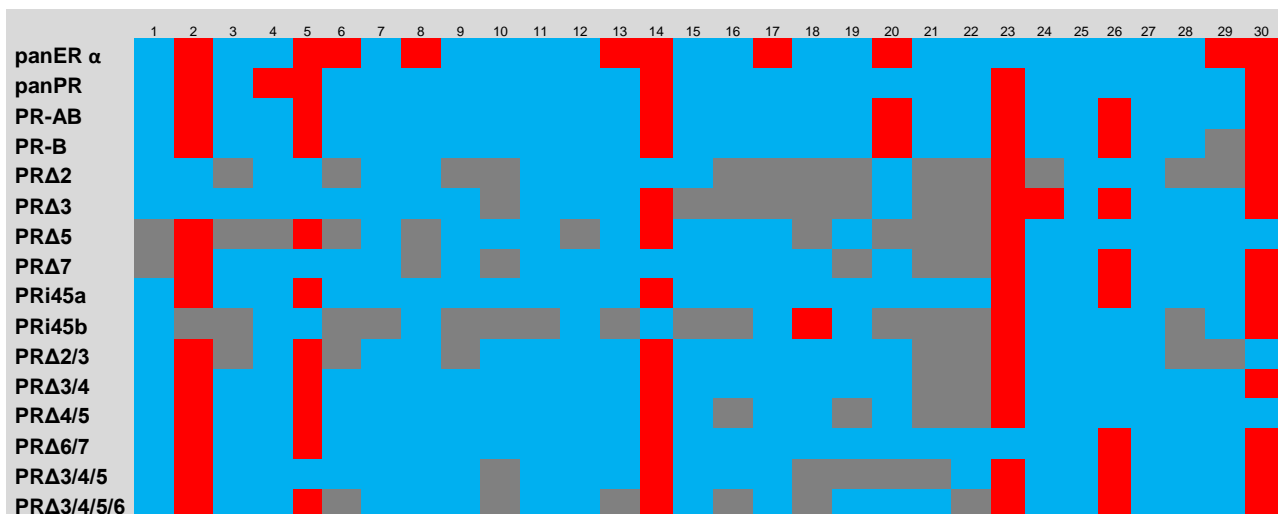
*Tabelle 8: Übersicht der untersuchten PR-Spleißvarianten*

|                 |            |            |            |            |            |          |          |          |           |
|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|----------|----------|----------|-----------|
| <b>Zielgen</b>  | PR<br>1B   | PR<br>2A   | PR<br>4A   | PR<br>5A   | PR<br>6A   | PR<br>7A | PR<br>8A | PR<br>9B | PR<br>10A |
| <b>Variante</b> | $\Delta 2$ | $\Delta 3$ | $\Delta 5$ | $\Delta 6$ | $\Delta 7$ | Exon T   | Exon S   | i45a     | i45b      |

|                 |              |              |              |              |              |                |                |                  |
|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------------|----------------|------------------|
| <b>Zielgen</b>  | PR<br>11A    | PR<br>12B    | PR<br>13A    | PR<br>14B    | PR<br>15A    | PR<br>17A      | PR<br>18B      | PR<br>19B        |
| <b>Variante</b> | $\Delta 2+3$ | $\Delta 3+4$ | $\Delta 4+5$ | $\Delta 5+6$ | $\Delta 6+7$ | $\Delta 3+4+5$ | $\Delta 4+5+6$ | $\Delta 3+4+5+6$ |

Nach durchgeführter Schmelzkurvenanalyse (siehe Kapitel 4.5.2) wurden die Expressionsergebnisse mit den Bezeichnungen „positiv“ und „negativ“ versehen. Da sich bei den Varianten PR $\Delta 6$ , PR Exon T, PR Exon S, PR $\Delta 5+6$  und PR $\Delta 4+5+6$  überwiegend negative Ergebnisse zeigten, wurde auf eine weitere Analyse dieser Varianten verzichtet. Für die weiteren Auswertungen wurden die als „negativ“ klassifizierten Proben ausgeschlossen, bzw. im Expressionsprofil als „graue Felder“ (siehe Abbildungen 6 bis 8) markiert.

Bei den ausgeschlossenen Schmelzkurven konnte nicht von den gesuchten Zielgenen ausgegangen werden, sodass das Einbeziehen dieser Daten einer Verfälschung der Daten gleichgekommen wäre. Allerdings wurden somit stets nur Proben, die eine Expression zeigten, in die statistische Analyse einbezogen, was bei der Betrachtung der Daten berücksichtigt werden muss. In einem zweiten Schritt wurden die Proben nach ihrer Expressionsstärke in 3 Gruppen unterteilt und farblich markiert. Die rot markierten Proben entsprechen einer „starken“, die blau markierten einer „mittleren“ und die grau markierten „keiner“ Expression, bzw. den negativen Schmelzkurven. „Starke“ Expressionen wurden als obere 15% der vorhandenen Werte, „mittlere“ Expressionen als untere 85% definiert. Somit konnten folgende Expressionsprofile (Abbildung 6 bis 9) für die einzelnen Subgruppen und die Normalgewebegruppe erstellt werden, anhand derer eine erste Einschätzung bezüglich des Auftretens der einzelnen Spleißvarianten innerhalb der Mammakarzinomproben möglich ist.



**Abbildung 6 Expressionsprofil G1, ERα positiv:** Rote Felder entsprechen einer „starker Expression“ (obere 15% der R-Werte), blaue Felder einer „mittleren Expression“ (untere 85% der R-Werte) und graue Felder „keiner Expression“ bzw. negativen Schmelzkurven.

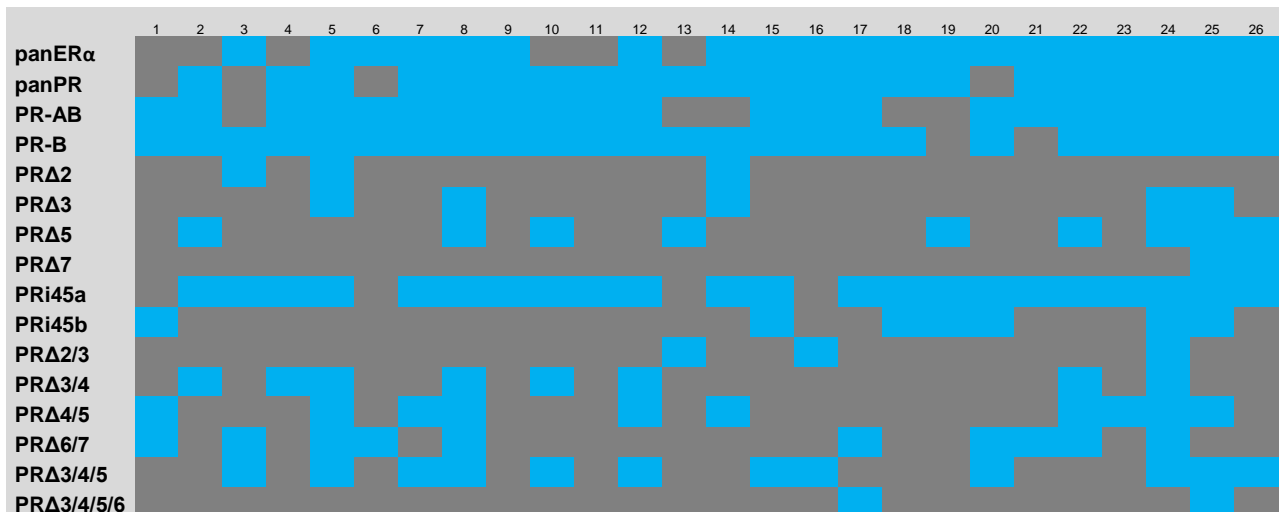


Abbildung 7: Expressionsprofil G3, ERα negativ: Rote Felder entsprechen einer „starker Expression“ (obere 15% der R-Werte), blaue Felder einer „mittleren Expression“ (untere 85% der R-Werte) und graue Felder „keiner Expression“ bzw. negativen Schmelzkurven.

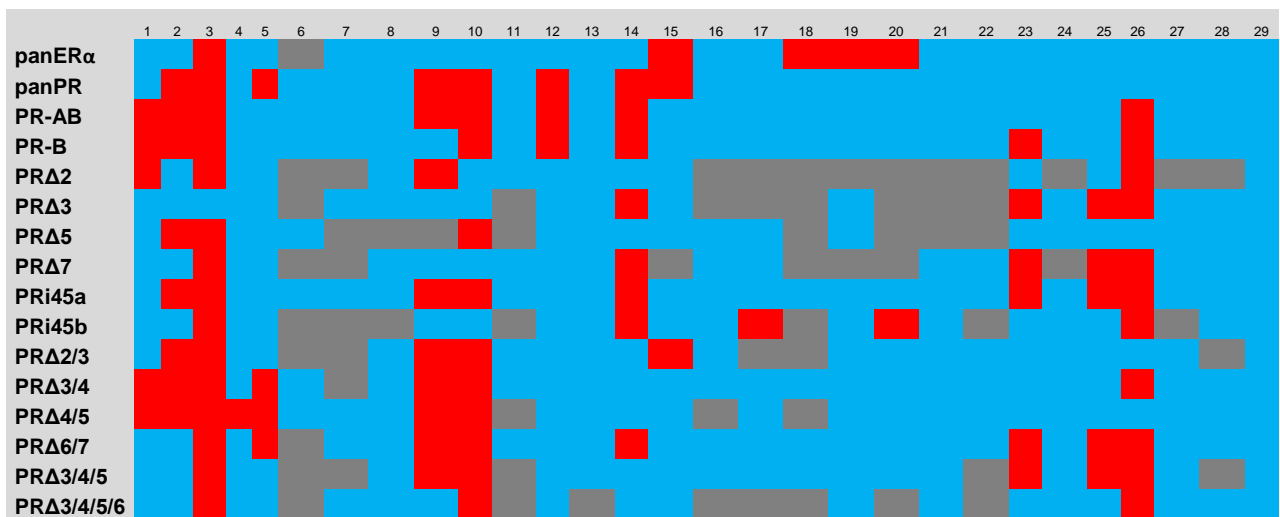
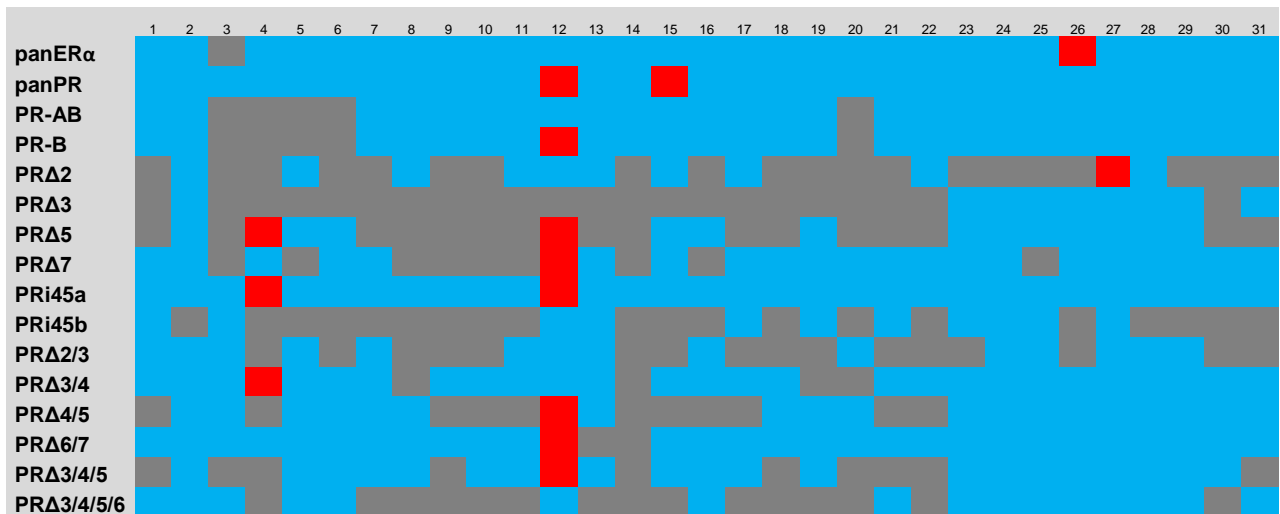


Abbildung 8 Expressionsprofil G3, ERα positiv: Rote Felder entsprechen einer „starker Expression“ (obere 15% der R-Werte), blaue Felder einer „mittleren Expression“ (untere 85% der R-Werte) und graue Felder „keiner Expression“ bzw. negativen Schmelzkurven.





*Abbildung 9 Expressionsprofil Normalgewebe:* Rote Felder entsprechen einer „starker Expression“ (obere 15% der R-Werte), blaue Felder einer „mittleren Expression“ (untere 85% der R-Werte) und graue Felder „keiner Expression“ bzw. negativen Schmelzkurven.

Um einen besseren Gesamteindruck zu erhalten zeigt die folgende Abbildung eine Darstellung aller Expressionsprofile in der Gesamtübersicht.

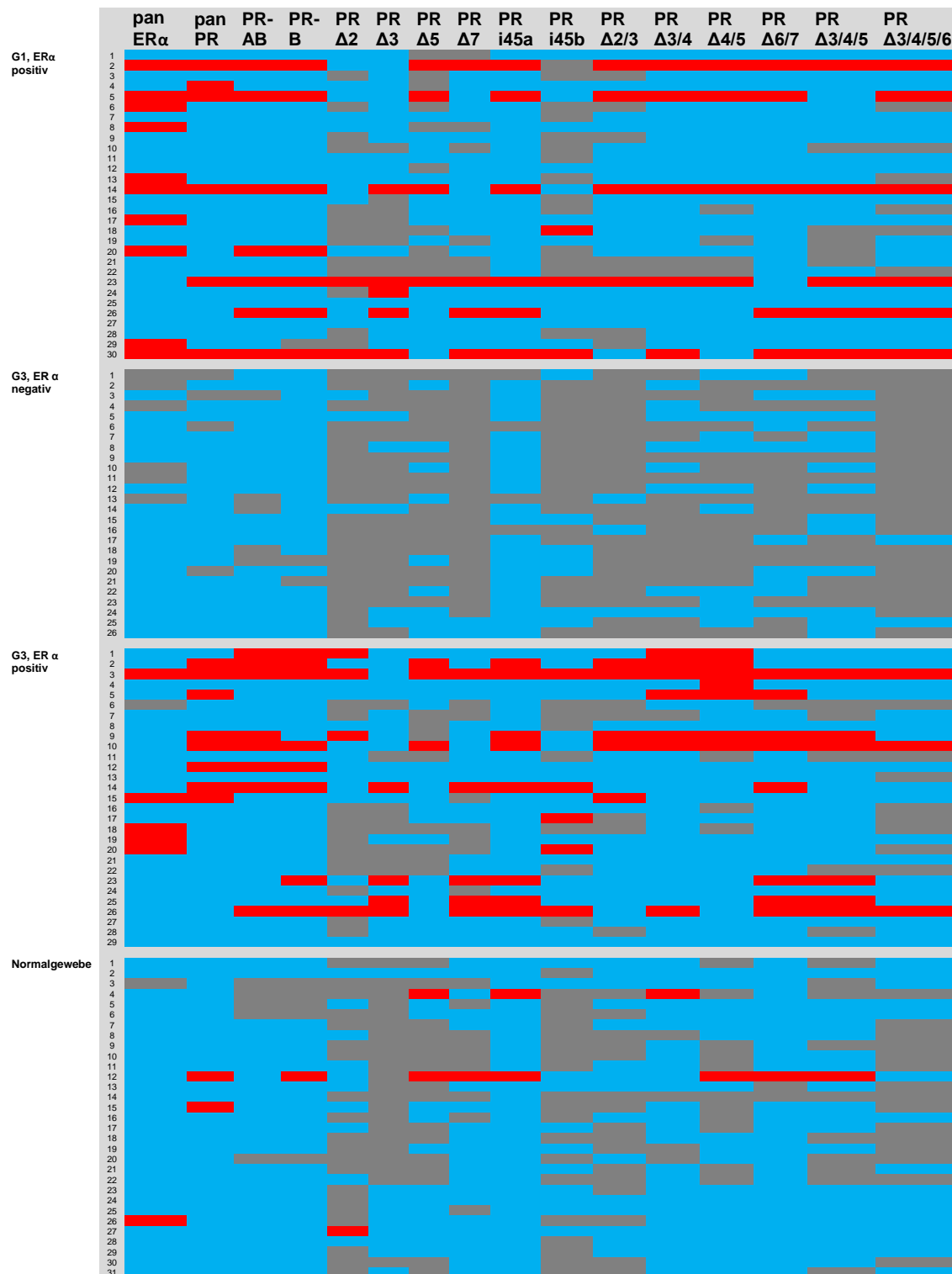


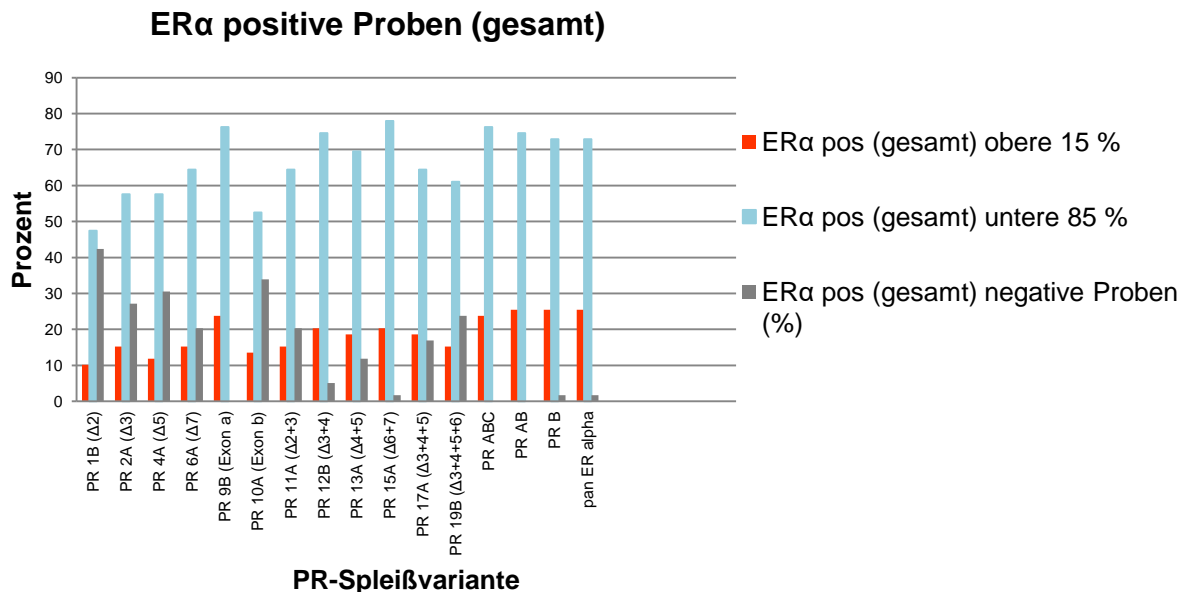
Abbildung 10 Darstellung aller Expressionsprofile in der Gesamtübersicht

Anhand dieser Expressionsprofile ist es sehr offensichtlich, dass sich vorwiegend in den ER $\alpha$  positiven Proben (siehe Abbildung 6 und Abbildung 8) viele Varianten nachweisen lassen. Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei den ER $\alpha$  negativen Proben ein Überwiegen an „negativen“ Schmelzkurven, die also keine klare Expression zeigen sowie keine einzige „starke“ Expression. Ein Blick auf die Verteilung der „starken“ Expressionen lässt v.a. eine spaltenförmige Anordnung erkennen, d.h. es handelt sich um bestimmte Patientinnen, die eine starke Expression mehrerer Varianten aufweisen. Diese lassen sich den ER $\alpha$  positiven Gruppen zuteilen. In Tabelle 9 sind die prozentualen Anteile der positiven Expressionen in den Subgruppen zu sehen. Auch hier bestätigt sich eine verminderte Expression an Spleißvarianten innerhalb der ER $\alpha$  negativen Subgruppe. Mit Ausnahme von PR i45a wurden die Varianten in unter 50% der Proben nachgewiesen.

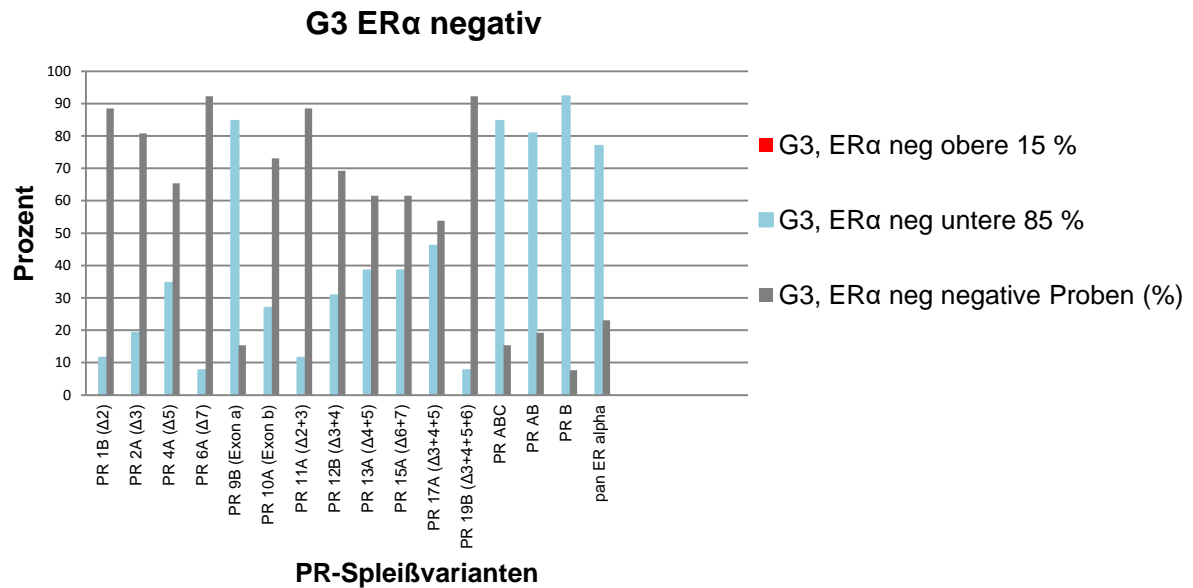
*Tabelle 9 Anteil an positiven Expressionen (positiven Schmelzkurven) innerhalb der Subgruppen.*

|   | positiver Anteil (%) | positiver Anteil (%) | positiver Anteil (%) | positiver Anteil (%) | positiver Anteil (%) | positiver Anteil (%) |
|---|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| <b>PR 1B (<math>\Delta 2</math>)</b>        | 41,4                 | 56,7                 | 11,5                 | 58,6                 | 57,6                 | 35,5                 |
| <b>PR 2A (<math>\Delta 3</math>)</b>        | 49,1                 | 73,3                 | 19,2                 | 72,4                 | 72,9                 | 29,0                 |
| <b>PR 4A (<math>\Delta 5</math>)</b>        | 56,0                 | 66,7                 | 34,6                 | 72,4                 | 69,5                 | 48,4                 |
| <b>PR 6A (<math>\Delta 7</math>)</b>        | 61,2                 | 80,0                 | 7,7                  | 79,3                 | 79,7                 | 71,0                 |
| <b>PR 9B (i45a)</b>                         | 96,6                 | 100,0                | 84,6                 | 100,0                | 100,0                | 100,0                |
| <b>PR 10A (i45b)</b>                        | 49,1                 | 53,3                 | 26,9                 | 79,3                 | 66,1                 | 35,5                 |
| <b>PR 11A (<math>\Delta 2+3</math>)</b>     | 56,0                 | 76,7                 | 11,5                 | 82,8                 | 79,7                 | 48,4                 |
| <b>PR 12B (<math>\Delta 3+4</math>)</b>     | 78,4                 | 93,3                 | 30,8                 | 96,6                 | 94,9                 | 87,1                 |
| <b>PR 13A (<math>\Delta 4+5</math>)</b>     | 70,7                 | 86,7                 | 38,5                 | 89,7                 | 88,1                 | 64,5                 |
| <b>PR 15A (<math>\Delta 6+7</math>)</b>     | 83,6                 | 100,0                | 38,5                 | 96,6                 | 98,3                 | 93,5                 |
| <b>PR 17A (<math>\Delta 3+4+5</math>)</b>   | 70,7                 | 83,3                 | 46,2                 | 82,8                 | 83,1                 | 67,7                 |
| <b>PR 19B (<math>\Delta 3+4+5+6</math>)</b> | 54,3                 | 80,0                 | 7,7                  | 72,4                 | 76,3                 | 51,6                 |
| <b>PR B</b>                                 | 93,1                 | 96,7                 | 92,3                 | 100,0                | 98,3                 | 83,9                 |
| <b>PR AB</b>                                | 91,4                 | 100,0                | 80,8                 | 100,0                | 100,0                | 83,9                 |
| <b>PR ABC</b>                               | 96,6                 | 100,0                | 84,6                 | 100,0                | 100,0                | 100,0                |
| <b>pan ER alpha</b>                         | 93,1                 | 100,0                | 76,9                 | 96,6                 | 98,3                 | 96,8                 |
|   | alle Proben          | G1, ERapos           | G3 ERaneg            | G3 ER $\alpha$ pos   | alle ER $\alpha$ pos | Normalgewebe         |

Abbildung 11 und 12 veranschaulichen einen Auszug der in Tabelle 9 gewonnenen Daten und stellen die deutlich geringeren Expressionen der einzelnen Varianten im ER $\alpha$  negativem Gewebe dar. Die Variante „PR i45a“ sticht hierbei besonders hervor und zeigt eine Expression in 84,6% der ER $\alpha$  negativen Proben. Im Vergleich der Werte von PRi45a in Tabelle 9 mit den Werten von PR ABC (panPR) ist eine absolute Übereinstimmung zu erkennen. Das Expressionsprofil des PRi45a zeigt weiterhin eine Ähnlichkeit zum Profil des PR B sowie des PR $\Delta$ 6+7. Darüber hinaus kann in über 3/4 der immunhistochemisch als ER $\alpha$  negativ klassifizierten Proben eine Expression des „panER $\alpha$ “ nachgewiesen werden. Die immunhistochemisch als ER $\alpha$  positiv klassifizierten Proben zeigen hingegen eine gute Übereinstimmung mit den Expressionsdaten der Genanalyse. Hier weisen 98,3% der Proben eine positive Expression des panER $\alpha$  auf.



**Abbildung 11** prozentualer Anteil an positiven Proben, d.h. sicherer Expression, der einzelnen PR-Varianten unter Einbezug aller ER $\alpha$  positiven Proben.



**Abbildung 12** prozentualer Anteil an positiven Proben, d.h. sicherer Expression, der einzelnen PR-Varianten unter Einbezug aller ERα negativen Proben.

## 5.2 Codierung der Expressionsprofile

Für die Untersuchung etwaiger Expressionsprofile der PR-Spleißvarianten, die gehäuft in Mammakarzinomgeweben auftreten, wurden die Gewebeproben mit einer spezifischen Codierung versehen. Hierbei steht Code 1 für „keine Expression“ (graue Zellen in Abb. 3-6), Code 2 für „mittlere Expression“ (blaue Zellen in Abb. 3-6) und Code 3 für „starke Expression“ (rote Zellen in Abb. 3-6). Würde also eine Gewebeprobe die Variante PRΔ2 stark, PRΔ3 mittelmäßig und PRΔ5 gar nicht exprimieren, so ergäbe sich die Codefolge „321“. Eine weitere vereinfachte Codefolge unterschied lediglich die Codes 1 für „keine Expression“ und Code 2 für „Expression jeglicher Art“. Anschließend wurden die Proben auf gleiche Codefolgen hin untersucht. In Bezug auf die unterschiedlichen Expressionsstärken ließen sich hierbei keine gehäuft Profile erkennen. Bei Anwendung des vereinfachten Codes zeigte sich der Code „222222222222“ in 23,33% der G1 ERα positiven Proben und in 41,38% der G3 ERα positiven Proben. Innerhalb der ERα negativen Subgruppe zeigte keine Gewebeprobe dieses Profil.

### 5.3 Subgruppenvergleiche der Spleißvarianten

Mittels eines T-Tests für unabhängige Stichproben wurde ein Vergleich der Expressionsstärken der einzelnen Spleißvarianten zwischen den verschiedenen Subgruppen und ihre Prüfung auf Signifikanz durchgeführt (siehe Tabelle 10).

**Tabelle 10** *p*-Werte des T-Tests für unabhängige Stichproben. Signifikante Ergebnisse gelb markiert. Es wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0.05$  angenommen.

|                 | PR<br>$\Delta 2$ | PR<br>$\Delta 3$ | PR<br>$\Delta 5$ | PR<br>$\Delta 7$ | PR<br>Exon<br>a | PR<br>Exon<br>b | PR<br>$\Delta 2+3$ | PR<br>$\Delta 3+4$ | PR<br>$\Delta 4+5$ | PR<br>$\Delta 6+7$ | PR<br>$\Delta 3+4$<br>+5 | PR<br>$\Delta 3+4$<br>+5+6 | PR<br>B | PR<br>AB | pan<br>PR |
|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|----------------------------|---------|----------|-----------|
| G1pos/<br>G3neg | 0,23             | 0,42             | 0,07             | 0,61             | 0,01*           | 0,02*           | 0,23               | 0,06               | 0,03*              | 0,05*              | 0,05*                    | 0,38                       | 0,00*   | 0,00*    | 0,00*     |
| G1pos/<br>G3pos | 0,24             | 0,41             | 0,65             | 0,93             | 0,67            | 0,75            | 0,35               | 0,29               | 0,28               | 0,25               | 0,75                     | 0,45                       | 0,26    | 0,35     | 0,34      |
| G3neg/<br>G3pos | 0,32             | 0,34             | 0,20             | 0,54             | 0,02*           | 0,02*           | 0,51               | 0,32               | 0,27               | 0,20               | 0,15                     | 0,29                       | 0,02*   | 0,01*    | 0,02*     |
| G1pos/<br>Norm  | 0,32             | 0,44             | 0,60             | 0,16             | 0,07            | 0,16            | 0,03*              | 0,08               | 0,03*              | 0,14               | 0,12                     | 0,18                       | 0,06    | 0,09     | 0,00*     |
| G3neg/<br>Norm  | 0,31             | 0,41             | 0,12             | 0,35             | 0,00*           | 0,00*           | 0,27               | 0,10               | 0,06               | 0,16               | 0,00*                    | 0,16                       | 0,00*   | 0,00*    | 0,00*     |
| G3pos/<br>Norm  | 0,16             | 0,61             | 0,47             | 0,09             | 0,08            | 0,11            | 0,17               | 0,14               | 0,17               | 0,09               | 0,20                     | 0,05*                      | 0,10    | 0,09     | 0,03*     |
| G1/G3           | 0,38             | 0,29             | 0,93             | 0,98             | 0,47            | 0,66            | 0,44               | 0,48               | 0,50               | 0,50               | 0,73                     | 0,59                       | 0,83    | 0,90     | 0,84      |
| G3/<br>Norm     | 0,23             | 0,78             | 0,77             | 0,11             | 0,45            | 0,35            | 0,20               | 0,22               | 0,27               | 0,20               | 0,44                     | 0,08                       | 0,34    | 0,24     | 0,19      |
| Ca/<br>Norm     | 0,27             | 0,57             | 0,70             | 0,13             | 0,26            | 0,26            | 0,19               | 0,24               | 0,27               | 0,21               | 0,30                     | 0,11                       | 0,28    | 0,18     | 0,10      |

**Tabelle 11** Mittelwerte der R-Werte innerhalb der Subgruppen.

|              | PR<br>$\Delta 2$ | PR<br>$\Delta 3$ | PR<br>$\Delta 5$ | PR<br>$\Delta 7$ | PR<br>Exon<br>a | PR<br>Exon<br>b | PR<br>$\Delta 2+3$ | PR<br>$\Delta 3+4$ | PR<br>$\Delta 4+5$ | PR<br>$\Delta 6+7$ | PR<br>$\Delta 3+4$<br>+5 | PR<br>$\Delta 3+4$<br>+5+6 | PR<br>B | PR<br>AB | PR<br>ABC |
|--------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|----------------------------|---------|----------|-----------|
| G1<br>ER pos | 0,78             | 1,51             | 2,23             | 0,10             | 2,80            | 0,41            | 0,28               | 1,88               | 1,01               | 0,24               | 5,05                     | 46,1                       | 26,6    | 4,57     | 15,9      |
| G3<br>ER neg | 0,09             | 0,45             | 0,08             | 0,001            | 0,06            | 0,02            | 0,01               | 0,26               | 0,05               | 0,004              | 0,24                     | 1,64                       | 0,47    | 0,09     | 0,36      |
| G3<br>ER pos | 1,51             | 0,31             | 2,97             | 0,11             | 3,43            | 0,45            | 0,57               | 3,97               | 2,44               | 0,50               | 6,09                     | 62,8                       | 56,3    | 8,51     | 25,0      |
| Normal       | 0,46             | 0,76             | 1,64             | 0,02             | 1,25            | 0,22            | 0,06               | 0,98               | 0,35               | 0,11               | 2,20                     | 22,2                       | 10,6    | 0,99     | 5,13      |

PR-ABC (panPR) ließ hierbei signifikante Unterschiede im Vergleich G3 ER $\alpha$  positiv/ G3 ER $\alpha$  negativ ( $p = 0,02$ ) und G3 ER $\alpha$  positiv/ Normalgewebe ( $p = 0,03$ ) erkennen. In den ER $\alpha$  positiven Geweben fanden sich also signifikant höhere Werte als in den ER $\alpha$  negativen und den Normalgeweben. Hoch signifikante Resultate ( $p < 0,01$ ) konnten in den Vergleichen G1 ER $\alpha$  positiv/G3 ER $\alpha$  negativ, G1 ER $\alpha$  positiv/Normalgewebe sowie Normalgewebe/G3 ER $\alpha$  negativ nachgewiesen werden. Auch hier wiesen die ER $\alpha$  positiven Gewebeproben bzw. das Normalgewebe signifikant höhere Mittelwerte in der Expression auf als die ER $\alpha$  negativen. Hingegen zeigte sich im Vergleich der jeweils ER $\alpha$  positiven G1 und G3 Proben sowie zwischen G1 und G3 mit Einschluss aller ER-Entitäten keine signifikanten Unterschiede. Für die Varianten PR i45a, PR i45b, PR $\Delta$ 4+5, PR $\Delta$ 6+7 und PR $\Delta$ 3+4+5 ergab sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den G1 ER $\alpha$  positiven und den G3 ER $\alpha$  negativen Proben. Die Analyse der G3 ER $\alpha$  positiven zu G3 ER $\alpha$  negativen Proben ergab eine Signifikanz für die Varianten PR i45a und PR i45. Diese beiden Varianten zeigten weiterhin genau wie PR $\Delta$ 3+4+5 einen signifikanten Unterschied zwischen G3 ER $\alpha$  negativem und gesundem Gewebe, mit höheren Werten in den Normalgewebeproben. Bei PR $\Delta$ 2+3 und PR $\Delta$ 4+5 wurden hingegen im G1 ER $\alpha$  positiven Gewebe und bei PR $\Delta$ 3+4+5+6 im G3 ER $\alpha$  positiven Gewebe höhere Werte als im Gesunden deutlich. Ein Vergleich der Werte zwischen den einzelnen Varianten war aufgrund der unterschiedlichen Primer-Effizienzen in den LightCycler real time PCR-Läufen nicht möglich.

#### **5.4 Korrelation der einzelnen PR-Spleißvarianten mit panPR**

Im nächsten Schritt erfolgte eine Korrelation zwischen dem Auftreten der Spleißvarianten und dem panPR im Brustkrebsgewebe. Hierfür wurde mittels SPSS 18 der Korrelationskoeffizient nach Spearmans Rho berechnet und dieser auf Signifikanz mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  getestet. Tabelle 12 zeigt die Ergebnisse dieser Auswertung.

Tabelle 12 Spearman rho Korrelation panPR / Varianten (nur Karzinom-Proben)

| panPR | PR<br>$\Delta 2$ | PR<br>$\Delta 3$ | PR<br>$\Delta 5$ | PR<br>$\Delta 7$ | PR<br>Exon a | PR<br>Exon b | PR<br>$\Delta 2+3$ | PR<br>$\Delta 3+4$ | PR<br>$\Delta 4+5$ | PR<br>$\Delta 6+7$ | PR<br>$\Delta 3+4+5$ | PR<br>$\Delta 3+4+5+6$ | PR<br>B | PR<br>AB |
|-------|------------------|------------------|------------------|------------------|--------------|--------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|------------------------|---------|----------|
| $r_s$ | ,702             | ,464             | ,928             | ,734             | ,960         | ,512         | ,900               | ,898               | ,909               | ,840               | ,823                 | ,899                   | ,969    | ,969     |
| p     | ,000             | ,001             | ,000             | ,000             | ,000         | ,000         | ,000               | ,000               | ,000               | ,000               | ,000                 | ,000                   | ,000    | ,000     |
| N     | 35               | 48               | 50               | 49               | 79           | 44           | 50                 | 64                 | 61                 | 61                 | 59                   | 47                     | 78      | 76       |

Als Ergebnis der Untersuchung ergeben sich stets signifikante Ergebnisse in der Korrelation der einzelnen Varianten mit dem panPR. Die Korrelationskoeffizienten zeigen sich kontinuierlich positiv mit  $r_s > 0$ , es besteht also ein gleichgerichteter Zusammenhang. Es bleibt jedoch unklar, ob sich die Variablen in einer bestimmten Weise bedingen. Anhand des Korrelationskoeffizienten nach Spearman kann eine Bewertung der Stärke des Zusammenhanges erfolgen. Um diese Stärke des Zusammenhanges zu beschreiben gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten, jedoch kein einheitliches Bewertungsregime für Korrelationskoeffizienten. In der vorliegenden Arbeit erfolgt die Einteilung nach Bühl und Zöfel (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13 Bewertung des Korrelationskoeffizienten (Bühl und Zöfel 2000)

| Korrelationskoeffizient | Bewertung                |
|-------------------------|--------------------------|
| $r_s \leq 0.2$ :        | sehr geringe Korrelation |
| $0.2 < r_s \leq 0.5$ :  | geringe Korrelation      |
| $0.5 < r_s \leq 0.7$ :  | mittlere Korrelation     |
| $0.7 < r_s \leq 0.9$ :  | starke Korrelation       |
| $r_s \geq 0.9$ :        | sehr starke Korrelation  |



Nach dieser Bewertung zeigten 6 der 14 Spleißvarianten eine sehr starke, 6 eine starke, und jeweils eine Variante eine mittlere und geringe Korrelation mit der Expression des panPR.

### 5.5 Korrelation der einzelnen PR-Spleißvarianten mit panER $\alpha$

Aus der grafischen Darstellung der Expressionsprofile lässt sich bereits ein Überwiegen der Spleißvarianten im ER $\alpha$  positiven Gewebe erkennen. Im Folgenden wurde mittels Spearmans Rho Korrelation die Expression der Spleißvarianten auf einen möglichen Zusammenhang und dessen Stärke mit der Expression des panER $\alpha$  hin untersucht (Tabelle 14).

**Tabelle 14** Spearman rho Korrelation panER $\alpha$ / PR-Spleißvarianten (nur Karzinom-Proben).

| PanER $\alpha$ | PR<br>$\Delta 2$ | PR<br>$\Delta 3$ | PR<br>$\Delta 5$ | PR<br>$\Delta 7$ | PR<br>Exon a | PR<br>Exon b | PR<br>$\Delta 2+3$ | PR<br>$\Delta 3+4$ | PR<br>$\Delta 4+5$ | PR<br>$\Delta 6+7$ | PR<br>$\Delta 3+4+5$ | PR<br>$\Delta 3+4+5+6$ | PR<br>B | PR<br>AB | Pan<br>PR |
|----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|--------------|--------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|------------------------|---------|----------|-----------|
| $r_s$          | ,330             | ,065             | ,630             | ,347             | ,598         | ,433         | ,436               | ,363               | ,517               | ,540               | ,451                 | ,352                   | ,649    | ,577     | ,601      |
| P              | ,049             | ,660             | ,000             | ,014             | ,000         | ,003         | ,002               | ,004               | ,000               | ,000               | ,000                 | ,015                   | ,000    | ,000     | ,000      |
| N              | 36               | 48               | 47               | 49               | 77           | 45           | 49                 | 61                 | 61                 | 65                 | 60                   | 47                     | 77      | 75       | 76        |

Bis auf Variante PR $\Delta 3$  war bei allen Varianten eine signifikante Korrelation mit panER $\alpha$  zu erkennen. Je höher die Anzahl der getesteten Proben, desto größer zeigte sich der statistische Unterschied.

Die Hälfte aller Spleißvarianten sowie der panPR zeigten eine starke Korrelation, die restlichen Varianten eine mittelmäßige. Alle Korrelationen waren gleichsinnig gerichtet mit  $r_s > 0$ .

## 5.6 Korrelation der PR-Spleißvarianten mit verschiedenen Markern

### Subgruppenvergleiche der Marker

Mittels eines T-Tests für unabhängige Stichproben wurde ein Vergleich der Expressionsstärke verschiedener Marker innerhalb der untersuchten Subgruppen durchgeführt und auf Signifikanz geprüft (siehe Tabelle 15).

**Tabelle 15** p-Werte des T-Tests für unabhängige Stichproben. Signifikante Ergebnisse gelb markiert. Es wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0.05$  angenommen.

|                 | Bcl-2  | STK 15 | Mybl-2 | Cathepsin L2 | Stromelysin-3 | Ki-67  | Cyclin B1 | Her2neu | WAF    | GRB 7  | CD 68  | BAG 1  | SCUBE 2 | E-Cadherin | PTEN   | GSTM 1 |
|-----------------|--------|--------|--------|--------------|---------------|--------|-----------|---------|--------|--------|--------|--------|---------|------------|--------|--------|
| G1pos/<br>G3neg | 0,0003 | 0,0001 | 0,0000 | 0,0819       | 0,4182        | 0,0008 | 0,0010    | 0,5015  | 0,0092 | 0,9570 | 0,8472 | 0,0012 | 0,0126  | 0,0464     | 0,0274 | 0,0093 |
| G1pos/<br>G3pos | 0,8519 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0026       | 0,0333        | 0,0002 | 0,0030    | 0,9017  | 0,8011 | 0,3038 | 0,6522 | 0,7368 | 0,2472  | 0,1902     | 0,3012 | 0,5524 |
| G1pos/<br>Norm  | 0,6882 | 0,0272 | 0,0010 | 0,0237       | 0,0380        | 0,0033 | 0,0032    | 0,0246  | 0,9008 | 0,2787 | 0,8513 | 0,0641 | 0,0141  | 0,0202     | 0,0061 | 0,2201 |
| G3neg/<br>G3pos | 0,0274 | 0,9624 | 0,6392 | 0,5591       | 0,0214        | 0,5869 | 0,2660    | 0,5544  | 0,0410 | 0,4132 | 0,5143 | 0,0114 | 0,0295  | 0,0127     | 0,0888 | 0,0182 |
| G3neg/<br>Norm  | 0,0001 | 0,0000 | 0,0000 | 0,8982       | 0,4862        | 0,0006 | 0,0001    | 0,1710  | 0,0189 | 0,4342 | 0,9920 | 0,0032 | 0,0013  | 0,8069     | 0,0000 | 0,0002 |
| G3pos/<br>Norm  | 0,6707 | 0,0000 | 0,0000 | 0,5626       | 0,0256        | 0,0000 | 0,0000    | 0,0635  | 0,9245 | 0,8854 | 0,5481 | 0,1996 | 0,0944  | 0,0048     | 0,0000 | 0,7018 |
| G1/G3           | 0,2688 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0473       | 0,2810        | 0,0003 | 0,0011    | 0,6351  | 0,2216 | 0,4970 | 0,8570 | 0,3000 | 0,0255  | 0,9254     | 0,0450 | 0,5617 |
| G3/<br>Norm     | 0,4020 | 0,0000 | 0,0000 | 0,8563       | 0,0994        | 0,0001 | 0,0001    | 0,1545  | 0,3873 | 0,7925 | 0,6908 | 0,6464 | 0,4643  | 0,0507     | 0,0000 | 0,0630 |
| Ca/<br>Norm     | 0,6240 | 0,0001 | 0,0000 | 0,4063       | 0,0957        | 0,0012 | 0,0004    | 0,1282  | 0,5802 | 0,5803 | 0,7171 | 0,3473 | 0,1149  | 0,0283     | 0,0000 | 0,0643 |

**Tabelle 16** Mittelwerte der Expression (R-Werte) der verschiedenen Marker innerhalb der Subgruppen.

| Mittelwert/Marker | Bcl-2 | STK 15 | Mybl-2 | Cathepsin L2 | Stromelysin-3 | Ki-67 | Cyclin B1 | Her2neu | WAF | GRB 7 | CD 68 | BAG 1 | SCUBE 2 | E-Cadherin | PTEN | GSTM 1 |
|-------------------|-------|--------|--------|--------------|---------------|-------|-----------|---------|-----|-------|-------|-------|---------|------------|------|--------|
| G1 ER pos         | 49,0  | 1,6    | 1,1    | 0,6          | 4,4           | 0,9   | 12,3      | 27      | 0,7 | 1,7   | 38,9  | 12,2  | 117,7   | 84,4       | 60,8 | 14,1   |
| G3 ER neg         | 13,1  | 5,4    | 6,7    | 3,1          | 3,1           | 3,0   | 28,9      | 36,1    | 0,3 | 1,7   | 37,3  | 4,5   | 1,9     | 53,8       | 28,1 | 1,7    |
| G3 ER pos         | 52,2  | 5,4    | 7,4    | 2,3          | 10,1          | 2,6   | 22,8      | 27,7    | 0,6 | 2,5   | 42,9  | 13,5  | 66,5    | 115,1      | 47,3 | 18,6   |
| Normal-gewebe     | 45,2  | 0,9    | 0,6    | 2,9          | 1,6           | 0,2   | 5,9       | 18      | 0,6 | 2,4   | 37,2  | 8,1   | 26,1    | 50,5       | 98,7 | 21,5   |

## Spearman-Korrelation der Marker mit den einzelnen Spleißvarianten

### **Bcl-2**

Bcl-2 ist als Protoonkogen bekannt, indem es die Zellen vor Apoptose schützt (Youle und Strasser 2008).

Bereits beim Betrachten der Mittelwerte (Tabelle 16) lässt sich erkennen, dass Bcl-2 deutlich höhere Werte innerhalb der ER $\alpha$  positiven Gewebeproben sowie der Normalgewebeproben im Vergleich zum ER $\alpha$  negativen Gewebe zeigt. Innerhalb der T-Testung der Subgruppen (Tabelle 15) zeigen sich signifikant höhere Werte bei den ER $\alpha$  positiven Gewebeproben und den Normalgeweben als bei den ER $\alpha$  negativen. Hingegen kann kein signifikanter Unterschied zwischen den Karzinom- und Normalgewebeproben, den ER $\alpha$  positiven und den Normalgewebeproben sowie zwischen den G1- und G3-Subgruppen nachgewiesen werden. Bcl-2 wird in 100% der ER $\alpha$  positiven Proben (siehe Tabelle 17) sowie in 97.6% der Karzinom-Proben exprimiert.

**Tabelle 17** Anteil (in%) an Expressionen von Bcl-2 innerhalb der verschiedenen Subgruppen.

| positive Expressionen (in %)      |       |
|-----------------------------------|-------|
| Gesamt                            | 96,6  |
| G1 ER $\alpha$ positiv            | 100,0 |
| G3 ER $\alpha$ negativ            | 92,3  |
| G3 ER $\alpha$ positiv            | 100,0 |
| Alle ER $\alpha$ positiven Proben | 100,0 |
| Normalgewebe                      | 93,5  |
| Karzinomgewebe                    | 97,6  |

In der Spearman-Korrelation des Markers Bcl-2 mit den untersuchten Progesteronrezeptor-Spleißvarianten zeigen sich folgende Ergebnisse:

**Tabelle 18** Korrelationsergebnisse zwischen Marker Bcl-2 und den einzelnen PR-Spleißvarianten. Signifikante p-Werte wurden gelb markiert, die farbliche Kennzeichnung der Korrelationsstärke des Spearman-Rho-Koeffizienten richtet sich nach Bühl und Zöfel 2000 (Tabelle 13).

|          | PR<br>$\Delta 2$ | PR<br>$\Delta 3$ | PR<br>$\Delta 5$ | PR<br>$\Delta 7$ | PR<br>i45a | PR<br>i45b | PR<br>$\Delta 2+3$ | PR<br>$\Delta 3+4$ | PR<br>$\Delta 4+5$ | PR<br>$\Delta 6+7$ | PR<br>$\Delta 3+4+5$ | PR<br>$\Delta 3+4$<br>+5+6 | PR<br>B | PR<br>AB | PR<br>ABC |
|----------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------|------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------------|---------|----------|-----------|
| $r_s$    | 0,31             | 0,32             | 0,37             | 0,24             | 0,48       | 0,62       | 0,36               | 0,27               | 0,40               | 0,28               | 0,37                 | 0,21                       | 0,49    | 0,4      | 0,46      |
| <b>p</b> | 0,07             | 0,03             | 0,00             | 0,01             | 0,00       | 0,00       | 0,01               | 0,03               | 0,00               | 0,02               | 0,00                 | 0,15                       | 0,00    | 0,00     | 0,00      |
| <b>N</b> | 35               | 48               | 65               | 49               | 80         | 45         | 49                 | 64                 | 62                 | 64                 | 60                   | 47                         | 80      | 79       | 80        |

Der Marker Bcl-2 korreliert signifikant mit 75% der untersuchten Spleißvarianten sowie mit den PR-Isoformen. Die Korrelationsstärken lagen dabei stets im geringen bis mittleren Bereich und kennzeichnen einen gleichgerichteten Zusammenhang. Für die Varianten PR $\Delta 2$ , PR $\Delta 7$  sowie PR $\Delta 3+4+5+6$  kann keine Korrelation nachgewiesen werden.

**STK-15**

Für den Marker STK-15 sind die deutlich höheren Mittelwerte (Tabelle 16) in der G3-Subgruppe auffällig. Die Analyse mittels T-Test (Tabelle 15) ergibt signifikante Unterschiede mit  $G3 > G1$ ,  $G3 > \text{Normalgewebe}$ ,  $G1 > \text{Normalgewebe}$  und  $\text{Karzinomgewebe} > \text{Normalgewebe}$ . Innerhalb der G3-Subgruppe zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den ER $\alpha$  positiven und negativen Gewebeproben. Innerhalb der Karzinomgruppen weisen alle der getesteten Proben, im Normalgewebe hingegen nur ein Anteil von 81% eine Expression von STK-15 auf (Tabelle 19).

**Tabelle 19** Anteil (in%) an Expressionen für STK-15 innerhalb der verschiedenen Subgruppen.

| <b>positive Expressionen (in %):</b> |       |
|--------------------------------------|-------|
| Gesamt                               | 94,8  |
| G1 ER $\alpha$ positiv               | 100,0 |
| G3 ER $\alpha$ negativ               | 100,0 |
| G3 ER $\alpha$ positiv               | 100,0 |
| Alle ER $\alpha$ positiven Proben    | 100,0 |
| Normalgewebe                         | 80,6  |
| Karzinomgewebe                       | 100,0 |

Die Korrelation zwischen STK-15 und den einzelnen PR-Spleißvarianten (Tabelle 20) lässt in 7 Varianten (58%), nämlich PR $\Delta$ 5, PRi45a, PRi45b, PR $\Delta$ 3+4, PR $\Delta$ 4+5, PR $\Delta$ 6+7 und PR $\Delta$ 3+4+5, negative schwache Korrelationskoeffizienten erkennen. Eine signifikante Korrelation zeigt sich jedoch nur mit PR B ( $r_s = -0.25$ ,  $p = 0.02$ ), PR AB ( $r_s = -0.26$ ,  $p = 0.02$ ) und mit panPR ( $r_s = -0.24$  und  $p = 0.03$ ). Auch hier präsentiert sich damit eine gegensinnig gerichtete Korrelation mit STK-15.

**Tabelle 20** Korrelationsergebnisse zwischen Marker STK-15 und den einzelnen PR-Spleißvarianten. Signifikante p-Werte wurden gelb markiert, die farbliche Kennzeichnung der Korrelationsstärke des Spearman-Rho-Koeffizienten richtet sich nach Bühl und Zöfel 2000 (Tabelle 13) mit  $r_s \leq 0.2$ : sehr geringe Korrelation;  $0.2 < r_s \leq 0.5$ : geringe Korrelation;  $0.5 < r_s \leq 0.7$ : mittlere Korrelation;  $0.7 < r_s \leq 0.9$ : starke Korrelation;  $r_s \geq 0.9$ : sehr starke Korrelation.

| STK15 | PR<br>Δ2 | PR<br>Δ3 | PR<br>Δ5 | PR<br>Δ7 | PR<br>i45a | PR<br>i45b | PR<br>Δ2+3 | PR<br>Δ3+4 | PR<br>Δ4+5 | PR<br>Δ6+7 | PR<br>Δ3+4+5 | PR<br>Δ3+4<br>+5+6 | PR B | PR<br>AB | PR<br>ABC |
|-------|----------|----------|----------|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------|--------------------|------|----------|-----------|
| $r_s$ | 0,13     | 0,17     | -,14     | 0,01     | -,13       | -,02       | 0,00       | -,09       | -,13       | -,08       | -,08         | 0,03               | -,25 | -,26     | -,24      |
| p     | 0,46     | 0,25     | 0,28     | 0,96     | 0,24       | 0,88       | 0,99       | 0,47       | 0,32       | 0,55       | 0,53         | 0,86               | ,02  | ,02      | 0,03      |
| N     | 36       | 48       | 66       | 49       | 81         | 45         | 50         | 64         | 62         | 65         | 61           | 47                 | 82   | 79       | 81        |

### Mybl-2

Ähnlich dem Marker STK-15 zeigen sich auch bei Mybl-2 höhere Mittelwerte (Tabelle 16) innerhalb der G3-Subgruppe. Die Analyse mittels T-Test (Tabelle 15) bestätigt die signifikanten Ergebnisse in den Subgruppenvergleichen, d.h. G3 > G1, G3 > Normalgewebe, G1 > Normalgewebe und Karzinomgewebe > Normalgewebe. Innerhalb der G3 ERα positiven / negativen Proben stellt sich kein signifikanter Unterschied dar. Erneut zeigen alle getesteten Karzinomproben eine Expression von Mybl-2 sowie 87% der Normalgewebeproben (Tabelle 21).

**Tabelle 21** Anteil (in%) an Expressionen für Mybl-2 innerhalb der verschiedenen Subgruppen.

| positive Expressionen (%) |       |
|---------------------------|-------|
| Gesamt                    | 96,6  |
| G1 ERα positiv            | 100,0 |
| G3 ERα negativ            | 100,0 |
| G3 ERα positiv            | 100,0 |
| Alle ERα positiven Proben | 100,0 |
| Normalgewebe              | 87,1  |
| Karzinomgewebe            | 100,0 |

Mit Ausnahme des PR $\Delta$ 2 zeigen sich für 92% der Spleißvarianten negative Korrelationskoeffizienten mit fünf signifikanten Ergebnissen (PR $\Delta$ 5, PRi45a, PR $\Delta$ 4+5, PR $\Delta$ 6+7, PR $\Delta$ 3+4+5). Ebenso sind signifikante Korrelationen mit den Isoformen und panPR mit ebenfalls negativem Spearman-rho-Koeffizienten zu erkennen (Tabelle 22).

**Tabelle 22** Korrelationsergebnisse zwischen Marker Mybl-2 und den einzelnen PR-Spleißvarianten. Signifikante p-Werte wurden gelb markiert, die farbliche Kennzeichnung der Korrelationsstärke des Spearman-Rho-Koeffizienten richtet sich nach Bühler und Zöfel 2000 (Tabelle 13)

| MYBL2 | PR<br>$\Delta$ 2 | PR<br>$\Delta$ 3 | PR<br>$\Delta$ 5 | PR<br>$\Delta$ 7 | PR<br>i45a | PR<br>i45b | PR<br>$\Delta$ 2+3 | PR<br>$\Delta$ 3+4 | PR<br>$\Delta$ 4+5 | PR<br>$\Delta$ 6+7 | PR<br>$\Delta$ 3+4+5 | PR<br>$\Delta$ 3+4<br>+5+6 | PR<br>B | PR<br>AB | PR<br>ABC |
|-------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------|------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------------|---------|----------|-----------|
| $r_s$ | 0,72             | -,14             | -,27             | -,07             | -,35       | -,01       | -,03               | -,21               | -,28               | -,33               | -,35                 | -,06                       | -,36    | -,38     | -,30      |
| p     | 0,68             | 0,34             | 0,03             | 0,61             | 0,00       | 0,94       | 0,86               | 0,09               | 0,03               | 0,01               | 0,01                 | 0,69                       | ,00     | ,00      | 0,01      |
| N     | 36               | 48               | 65               | 49               | 81         | 45         | 50                 | 64                 | 62                 | 65                 | 61                   | 47                         | 82      | 79       | 81        |

### **Cathepsin L2**

Die Cathepsin L2 Expression zeigt geringere Mittelwerte in der G1 Gruppe (Tabelle 16). Im T-Test sind signifikante Unterschiede innerhalb der Vergleiche der G1 ER $\alpha$  positiven/G3 ER $\alpha$  positiven, G1 ER $\alpha$  positiven/Normalgewebe sowie G1/G3 Subgruppen zu sehen. Sowohl im Normalgewebe als auch in der G3-Subgruppe zeigen sich signifikant höhere Werte als in den G1-Geweben. Die Analyse der prozentualen Anteile an Cathepsin-L2-positiv getesteten Proben ergibt einen geringeren Anteil in der G1-Subgruppe sowie im Normalgewebe (Tabelle 23 ).

**Tabelle 23** Anteil (in%) an Expressionen für Cathepsin L2 innerhalb der verschiedenen Subgruppen.

| positive Expressionen (%) |      |
|---------------------------|------|
| Gesamt                    | 86,2 |
| G1 ERα positiv            | 76,7 |
| G3 ERα negativ            | 96,2 |
| G3 ERα positiv            | 96,6 |
| Alle ERα positiven Proben | 86,4 |
| Normalgewebe              | 77,4 |
| Karzinomgewebe            | 89,4 |

Cathepsin-L2 weist in der Spearman-Korrelation lediglich ein signifikantes Ergebnis mit PRΔ6+7 auf ( $r_s = -0,3$ ;  $p = 0,02$ ). Hier zeigt sich ein geringer entgegengesetzter Zusammenhang (Tabelle 24).

**Tabelle 24** Korrelationsergebnisse zwischen Marker Cathepsin-L2 und den einzelnen PR-Spleißvarianten. Signifikante p-Werte wurden gelb markiert, die farbliche Kennzeichnung der Korrelationsstärke des Spearman-Rho-Koeffizienten richtet sich nach Bühl und Zöfel 2000 (Tabelle 13).

| Cathepsin L2 | PR Δ2 | PR Δ3 | PR Δ5 | PR Δ7 | PR i45a | PR i45b | PR Δ2+3 | PR Δ3+4 | PR Δ4+5 | PR Δ6+7 | PR Δ3+4+5 | PR Δ3+4+5+6 | PR B | PR AB | Pan PR |
|--------------|-------|-------|-------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----------|-------------|------|-------|--------|
| $r_s$        | 0,20  | 0,17  | -,02  | 0,00  | -,14    | 0,08    | -,22    | -,23    | -,12    | -,30    | -,26      | 0,05        | -,11 | -,16  | -,10   |
| <b>p</b>     | 0,26  | 0,27  | 0,90  | 0,98  | 0,26    | 0,61    | 0,16    | 0,09    | 0,40    | 0,02    | 0,05      | 0,77        | ,34  | ,18   | 0,39   |
| <b>N</b>     | 32    | 43    | 61    | 43    | 71      | 40      | 43      | 57      | 56      | 57      | 56        | 41          | 72   | 70    | 71     |

### Stromelysin-3

Stromelysin-3 zeigt einen merklich höheren Mittelwert in der G3 ERα positiven im Vergleich zu den anderen Subgruppen. Des Weiteren ist ein deutlich geringerer Mittelwert innerhalb der Normalgewebe sichtbar (Tabelle 16). Diesbezüglich bestätigt auch der T-Test für die G3 ERα positiven Gewebe signifikant höhere Werte im Vergleich zu den G1 ERα positiven, G3 ERα negativen und den Normalgeweben. Keine



signifikanten Unterschiede zeigen sich im Vergleich G3 ER $\alpha$  negativ/G1 ER $\alpha$  positiv, G3 ER $\alpha$  negativ/Normalgewebe und zwischen G3/G1 (Tabelle 15). Innerhalb der Normalgewebe überwiegt der Anteil an negativen Proben (siehe Tabelle 25).

**Tabelle 25** Anteil (in%) an Expressionen für Stromelysin-3 innerhalb der verschiedenen Subgruppen.

| positive Expressionen (%)         |       |
|-----------------------------------|-------|
| Gesamt                            | 82,8  |
| G1 ER $\alpha$ positiv            | 93,3  |
| G3 ER $\alpha$ negativ            | 100,0 |
| G3 ER $\alpha$ positiv            | 96,6  |
| Alle ER $\alpha$ positiven Proben | 94,9  |
| Normalgewebe                      | 45,2  |
| Karzinomgewebe                    | 96,5  |

Innerhalb der Spearman-Rho-Korrelationsdaten (Tabelle 26) ist lediglich ein signifikanter gleichsinniger Zusammenhang geringer Stärke mit der PR $\Delta$ 2 Variante festzustellen.

**Tabelle 26** Korrelationsergebnisse zwischen Marker Stromelysin-3 und den einzelnen PR-Spleißvarianten. Signifikante p-Werte wurden gelb markiert, die farbliche Kennzeichnung der Korrelationsstärke des Spearman-Rho-Koeffizienten richtet sich nach Bühl und Zöfel 2000 (Tabelle 13).

| Stromelysin-3 | PR $\Delta$ 2 | PR $\Delta$ 3 | PR $\Delta$ 5 | PR $\Delta$ 7 | PR i45a | PR i45b | PR $\Delta$ 2+3 | PR $\Delta$ 3+4 | PR $\Delta$ 4+5 | PR $\Delta$ 6+7 | PR $\Delta$ 3+4+5 | PR $\Delta$ 3+4+5+6 | PR B | PR AB | PR ABC |
|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------|---------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|---------------------|------|-------|--------|
| $r_s$         | 0,35          | -,16          | -,12          | -,06          | 0,11    | 0,26    | 0,14            | -,12            | 0,07            | 0,01            | 0,00              | -,11                | ,21  | ,13   | 0,22   |
| <b>p</b>      | 0,04          | 0,28          | 0,36          | 0,69          | 0,34    | 0,09    | 0,35            | 0,37            | 0,60            | 0,92            | 0,98              | 0,46                | ,07  | ,25   | 0,05   |
| <b>N</b>      | 35            | 47            | 59            | 47            | 79      | 44      | 48              | 62              | 60              | 63              | 61                | 46                  | 80   | 77    | 79     |

**Ki-67**

Die G3 Subgruppen präsentieren für Ki-67 höhere Mittelwerte als die anderen Subgruppen (Tabelle 16). Im T-Test zeigen sich signifikante Mittelwertunterschiede für alle Subgruppenvergleiche bis auf den Vergleich G3 ER $\alpha$  negativ/G3 ER $\alpha$  positiv (Tabelle 15). In den Karzinomgruppen weist ein größerer Anteil an Proben eine Expression von Ki-67 auf als in den Normalgewebegruppen (Tabelle 27).

**Tabelle 27** Anteil (in%) an Expressionen für Ki-67 innerhalb der verschiedenen Subgruppen.

| <b>positive Expressionen (%)</b>  |       |
|-----------------------------------|-------|
| Gesamt                            | 83,6  |
| G1 ER $\alpha$ positiv            | 93,3  |
| G3 ER $\alpha$ negativ            | 92,3  |
| G3 ER $\alpha$ positiv            | 100,0 |
| Alle ER $\alpha$ positiven Proben | 96,6  |
| Normalgewebe                      | 51,6  |
| Karzinomgewebe                    | 95,3  |

Für den Proliferationsmarker Ki-67 kann keine signifikante Spearman-Rho-Korrelation mit den einzelnen PR-Spleißvarianten nachgewiesen werden. Es zeigt sich jedoch mit 66,67% der Varianten ein eher negativ gerichteter Zusammenhang, wobei die Korrelationskoeffizienten eine sehr schwache Stärke erkennen lassen (siehe Tabelle 28).

**Tabelle 28** Korrelationsergebnisse zwischen Marker Ki-67 und den einzelnen PR-Spleißvarianten. Signifikante p-Werte wurden gelb markiert, die farbliche Kennzeichnung der Korrelationsstärke des Spearman-Rho-Koeffizienten richtet sich nach Bühl und Zöfel 2000 (Tabelle 13).

| Ki67           | PR<br>Δ2 | PR<br>Δ3 | PR<br>Δ5 | PR<br>Δ7 | PR<br>i45a | PR<br>i45b | PR<br>Δ2+3 | PR<br>Δ3+4 | PR<br>Δ4+5 | PR<br>Δ6+7 | PR<br>Δ3+4+5 | PR<br>Δ3+4+5+6 | PR<br>B | PR<br>AB | PR<br>ABC |
|----------------|----------|----------|----------|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------|----------------|---------|----------|-----------|
| r <sub>s</sub> | -,05     | 0,12     | -,04     | 0,15     | -0,10      | 0,08       | 0,06       | -0,08      | -0,06      | -0,17      | -,12         | -,01           | -0,17   | -0,18    | -0,10     |
| p              | 0,77     | 0,45     | 0,76     | 0,32     | 0,40       | 0,60       | 0,69       | 0,54       | 0,64       | 0,19       | 0,39         | 0,96           | 0,14    | 0,13     | 0,38      |
| N              | 33       | 44       | 57       | 46       | 77         | 43         | 48         | 60         | 58         | 61         | 57           | 44             | 78      | 75       | 77        |

### Cyclin-B1

Cyclin B1 zeigt ebenso wie Ki-67, STK-15 und Mybl-2 in allen Subgruppen-Vergleichen signifikante Unterschiede, ausgeschlossen des Vergleichs zwischen der G3-Subgruppe und den ERα positiven/negativen Geweben (Tabelle 15). Die Betrachtung der Mittelwerte lässt folgende Schlussfolgerung zu: G3 ERα negativ > G3 ERα positiv > G1 ERα positiv > Normalgewebe (Tabelle 16). Weitergehend kann ein signifikanter Unterschied zwischen der G1 und G3-Subgruppe festgestellt werden (Tabelle 15)

Cyclin-B1 wird im Karzinomgewebe häufiger detektiert als im Normalgewebe, wie der Anteil der positiven Proben (Tabelle 29) erkennen lässt.

**Tabelle 29** Anteil (in%) an Expressionen für Cyclin B1 innerhalb der verschiedenen Subgruppen.

| positive Expressionen (%) |       |
|---------------------------|-------|
| Gesamt                    | 86,2  |
| G1 ERα positiv            | 93,3  |
| G3 ERα negativ            | 96,2  |
| G3 ERα positiv            | 100,0 |
| Alle ERα positiven Proben | 96,6  |
| Normalgewebe              | 58,1  |
| Karzinomgewebe            | 96,5  |

In Bezug auf die einzelnen Spleißvarianten korreliert Cyclin B1 signifikant positiv mit der Variante PR $\Delta$ 7 mit einer geringen Korrelationsstärke ( $r_s = 0,36$ ;  $p = 0,01$ ). In Betrachtung des panPR und der PR-Isoformen fallen schwache negative Korrelationskoeffizienten, jedoch ohne Signifikanz, auf (siehe Tabelle 30).

**Tabelle 30** Korrelationsergebnisse zwischen Marker Cyclin B1 und den einzelnen PR-Spleißvarianten. Signifikante p-Werte wurden gelb markiert, die farbliche Kennzeichnung der Korrelationsstärke des Spearman-Rho-Koeffizienten richtet sich nach Bühl und Zöfel 2000 (Tabelle 13).

| CyclinB1 | PR $\Delta$ 2 | PR $\Delta$ 3 | PR $\Delta$ 5 | PR $\Delta$ 7 | PR i45a | PR i45b | PR $\Delta$ 2+3 | PR $\Delta$ 3+4 | PR $\Delta$ 4+5 | PR $\Delta$ 6+7 | PR $\Delta$ 3+4+5 | PR $\Delta$ 3+4+5+6 | PR B | PR AB | PR ABC |
|----------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------|---------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|---------------------|------|-------|--------|
| $r_s$    | 0,13          | 0,18          | -,05          | 0,36          | 0,00    | -,07    | 0,01            | 0,06            | -,04            | -,06            | 0,02              | 0,24                | -,07 | -,07  | -,07   |
| <b>p</b> | 0,45          | 0,22          | 0,70          | 0,01          | 0,98    | 0,64    | 0,95            | 0,64            | 0,78            | 0,67            | 0,88              | 0,11                | ,55  | ,56   | 0,52   |
| <b>N</b> | 35            | 47            | 59            | 47            | 78      | 45      | 49              | 61              | 60              | 63              | 59                | 46                  | 79   | 76    | 78     |

### Her2neu

Für den Marker Her2neu ergeben sich deutlich höhere Mittelwert in der ER $\alpha$  negativen Subgruppe (Tabelle 16), während sich die ER $\alpha$  positiven Gruppen in ihrem Mittelwert ähneln. Bei der T-Testung wird lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen der G1 ER $\alpha$  positiven und dem Normalgewebe nachgewiesen. Die Untersuchung von G3 ER $\alpha$  positivem zu Normalgewebe zeigt einen Unterschied von  $p = 0,06$ . Es wird kein signifikantes Ergebnis im Vergleich Karzinom/Normalgewebe gefunden (Tabelle 15) und auch Tabelle 31 zeigt sowohl in den Karzinomgeweben (100%) als auch in den Normalgeweben (96,8%) einen hohen Anteil an Her2neu-Expressionen.

**Tabelle 31** Anteil (in%) an Expressionen für Her2neu innerhalb der verschiedenen Subgruppen.

| positive Expressionen (%) |       |
|---------------------------|-------|
| Gesamt                    | 99,1  |
| G1 ERα positiv            | 100,0 |
| G3 ERα negativ            | 100,0 |
| G3 ERα positiv            | 100,0 |
| Alle ERα positiven Proben | 100,0 |
| Normalgewebe              | 96,8  |
| Karzinomgewebe            | 100,0 |

Viele signifikante Korrelationen zeigen sich im Spearman-Rho-Test (Tabelle 32) zwischen Her2neu und den einzelnen Varianten, genauer gesagt PR $\Delta$ 2, PR $\Delta$ 5, PRi45a, PRi45b, PR $\Delta$ 2+3, PR $\Delta$ 4+5 und PR $\Delta$ 6+7, sowie der Isoform PRB und dem panPR. Auffällig ist hierbei ein im Vergleich etwas höherer Korrelationskoeffizient mit PR $\Delta$ 2 und PR $\Delta$ 5, welche ein hoch signifikantes Ergebnis aufweisen. Bis auf PR $\Delta$ 3 sind die Korrelationkoeffizienten stets positiv gerichtet.

**Tabelle 32** Korrelationsergebnisse zwischen Marker Her2neu und den einzelnen PR-Spleißvarianten. Signifikante p-Werte wurden gelb markiert, die farbliche Kennzeichnung der Korrelationsstärke des Spearman-Rho-Koeffizienten richtet sich nach Bühler und Zöfel 2000 (Tabelle 13).

| Her2 neu       | PR $\Delta$ 2 | PR $\Delta$ 3 | PR $\Delta$ 5 | PR $\Delta$ 7 | PR i45a | PR i45b | PR $\Delta$ 2+3 | PR $\Delta$ 3+4 | PR $\Delta$ 4+5 | PR $\Delta$ 6+7 | PR $\Delta$ 3+4+5 | PR $\Delta$ 3+4+5+6 | PR B | PR AB | PR ABC |
|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------|---------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|---------------------|------|-------|--------|
| r <sub>s</sub> | 0,58          | -,12          | 0,40          | 0,20          | 0,23    | 0,41    | 0,31            | 0,14            | 0,27            | 0,28            | 0,20              | 0,10                | 0,27 | 0,19  | 0,24   |
| p              | 0,00          | 0,44          | 0,00          | 0,16          | 0,04    | 0,01    | 0,03            | 0,26            | 0,03            | 0,03            | 0,12              | 0,51                | ,01  | ,10   | 0,03   |
| N              | 36            | 48            | 66            | 49            | 81      | 45      | 50              | 64              | 62              | 65              | 61                | 47                  | 82   | 79    | 81     |

**p21/WAF**

In den ER $\alpha$  positiven sowie im Normalgewebe finden sich ähnliche mittlere Expressionswerte für p21/WAF (Tabelle 16). Der T-Test bestätigt diese erste Auffälligkeit mit signifikanten Unterschieden zwischen G1 ER $\alpha$  positiv/G3 ER $\alpha$  negativ, G3 ER $\alpha$  positiv/G3 ER $\alpha$  negativ und Normalgewebe/G3 ER $\alpha$  negativ. Zwischen den ER $\alpha$  positiven und Normalgewebeproben sowie den gesamten Karzinom- und Normalgeweben ergeben sich keine Signifikanzen. Zwischen den sich nur im Grading unterscheidenden Gruppen ist ebenfalls kein signifikanter Unterschied festzustellen. Gleiche signifikante Markierungen finden sich bei Bcl-2 und BAG-1 (Tabelle 15).

WAF zeigt im Gegensatz zu den zuvor besprochenen Marker einen etwas größeren Anteil an negativen Proben innerhalb der Normalgewebegruppen und auch innerhalb der ER $\alpha$  negativen Subgruppe (Tabelle 33).

**Tabelle 33** Anteil (in%) an Expressionen für p21/WAF innerhalb der verschiedenen Subgruppen.

| positive Expressionen (%) |      |
|---------------------------|------|
| Gesamt                    | 69,0 |
| G1 ER $\alpha$ positiv    | 76,7 |
| G3 ER $\alpha$ negativ    | 65,4 |
| G3 ER $\alpha$ positiv    | 96,6 |
| Alle ER positiven Proben  | 86,4 |
| Normalgewebe              | 38,7 |
| Karzinomgewebe            | 80,0 |

Zwischen p21/WAF und den einzelnen Spleißvarianten ergeben sich keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 34).

**Tabelle 34** Korrelationsergebnisse zwischen Marker p21/WAF und den einzelnen PR-Spleißvarianten. Signifikante p-Werte wurden gelb markiert, die farbliche Kennzeichnung der Korrelationsstärke des Spearman-Rho-Koeffizienten richtet sich nach Bühl und Zöfel 2000 (Tabelle 13).

| p21/<br>WAF | PR<br>Δ2 | PR<br>Δ3 | PR<br>Δ5 | PR<br>Δ7 | PR<br>i45a | PR<br>i45b | PR<br>Δ2+3 | PR<br>Δ3+4 | PR<br>Δ4+5 | PR<br>Δ6+7 | PR<br>Δ3+4+5 | PR<br>Δ3+4<br>+5+6 | PR<br>B | PR<br>AB | PR<br>ABC |
|-------------|----------|----------|----------|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------|--------------------|---------|----------|-----------|
| $r_s$       | 0,12     | -,17     | 0,27     | 0,12     | 0,18       | 0,15       | 0,17       | 0,14       | 0,24       | 0,22       | -,04         | 0,19               | ,20     | ,20      | 0,23      |
| p           | 0,52     | 0,29     | 0,06     | 0,44     | 0,15       | 0,37       | 0,28       | 0,31       | 0,09       | 0,10       | 0,81         | 0,23               | ,11     | ,11      | 0,07      |
| N           | 29       | 42       | 48       | 41       | 64         | 40         | 41         | 54         | 51         | 56         | 51           | 43                 | 65      | 64       | 63        |

### GRB-7

Innerhalb des T-Tests können keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Mittelwerte gefunden werden. Im Anbetracht der Expressionen werden etwas weniger positive Proben innerhalb der Normalgewebegruppe detektiert (Tabelle 35).

**Tabelle 35** Anteil (in%) an Expressionen für GRB-7 innerhalb der verschiedenen Subgruppen.

| positive Expressionen (%) |       |
|---------------------------|-------|
| Gesamt                    | 89,7  |
| G1 ERα positiv            | 93,3  |
| G3 ERα negativ            | 92,3  |
| G3 ERα positiv            | 100,0 |
| Alle ERα positiven Proben | 96,6  |
| Normalgewebe              | 74,2  |
| Karzinomgewebe            | 95,5  |

Eine Korrelation mit positivem Korrelationskoeffizienten ( $r_s = 0.31$ ) findet sich zwischen GRB-7 und PRΔ5 (Tabelle 36). PRΔ5 zeigt bereits bei Her2neu eine im Vergleich größere Expressionstärke mit hoher Signifikanz.

**Tabelle 36** Korrelationsergebnisse zwischen Marker GRB-7 und den einzelnen PR-Spleißvarianten. Signifikante p-Werte wurden gelb markiert, die farbliche Kennzeichnung der Korrelationsstärke des Spearman-Rho-Koeffizienten richtet sich nach Bühl und Zöfel 2000 (Tabelle 13).

| GRB7     | PR<br>Δ2 | PR<br>Δ3 | PR<br>Δ5 | PR<br>Δ7 | PR<br>i45a | PR<br>i45b | PR<br>Δ2+3 | PR<br>Δ3+4 | PR<br>Δ4+5 | PR<br>Δ6+7 | PR<br>Δ3+4+5 | PR<br>Δ3+4<br>+5+6 | PR<br>B | PR<br>AB | PR<br>ABC |
|----------|----------|----------|----------|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------|--------------------|---------|----------|-----------|
| $r_s$    | 0,12     | -,15     | 0,31     | 0,06     | 0,08       | 0,25       | 0,09       | -0,08      | 0,16       | -0,03      | 0,00         | 0,01               | ,17     | ,10      | 0,13      |
| <b>p</b> | 0,51     | 0,34     | 0,02     | 0,67     | 0,49       | 0,11       | 0,53       | 0,57       | 0,23       | 0,81       | 0,98         | 0,93               | ,13     | ,40      | 0,25      |
| <b>N</b> | 34       | 44       | 61       | 47       | 77         | 44         | 49         | 60         | 58         | 61         | 57           | 45                 | 78      | 75       | 77        |

### CD-68

Wie bereits bei GRB-7 kann auch für CD-68 kein signifikanter T-Test zwischen den Subgruppen ermittelt werden (Tabelle 15). GRB-7 zeigt in allen Subgruppen in nahezu allen Proben eine Expression (Tabelle 37).

**Tabelle 37** Anteil (in%) an Expressionen für CD-68 innerhalb der verschiedenen Subgruppen.

| positive Expressionen (%) |       |
|---------------------------|-------|
| Gesamt                    | 98,3  |
| G1 ERα positiv            | 100,0 |
| G3 ERα negativ            | 100,0 |
| G3 ERα positiv            | 100,0 |
| Alle ERα positiven Proben | 100,0 |
| Normalgewebe              | 93,5  |
| Karzinomgewebe            | 100,0 |

Mit den Spleißvarianten PRΔ3 und PRΔ2+3 ergibt sich für CD-68 eine signifikante Korrelation (Tabelle 38). Während PRΔ3 einen negativen Korrelationskoeffizienten aufweist ( $r_s = -0,46$ ;  $p = 0,00$ ), zeigt sich für PRΔ2+3 einen gleichgerichteten Zusammenhang ( $r_s = 0,37$ ;  $p = 0,01$ ). Es zeigt sich jedoch keine Korrelation mit panPR (Tabelle 38).



**Tabelle 38** Korrelationsergebnisse zwischen Marker CD-68 und den einzelnen PR-Spleißvarianten. Signifikante p-Werte wurden gelb markiert, die farbliche Kennzeichnung der Korrelationsstärke des Spearman-Rho-Koeffizienten richtet sich nach Bühler und Zöfel 2000 (Tabelle 13).

| CD 68    | PR Δ2 | PR Δ3 | PR Δ5 | PR Δ7 | PR i45a | PR i45b | PR Δ2+3 | PR Δ3+4 | PR Δ4+5 | PR Δ6+7 | PR Δ3+4+5 | PR Δ3+4+5+6 | PR B | PR AB | PR ABC |
|----------|-------|-------|-------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----------|-------------|------|-------|--------|
| $r_s$    | 0,07  | -,46  | 0,07  | -,03  | 0,14    | 0,04    | 0,37    | 0,10    | 0,18    | 0,05    | 0,01      | 0,22        | ,06  | ,03   | 0,10   |
| <b>p</b> | 0,67  | 0,00  | 0,58  | 0,82  | 0,22    | 0,79    | 0,01    | 0,42    | 0,16    | 0,69    | 0,93      | 0,14        | ,62  | ,79   | 0,38   |
| <b>N</b> | 36    | 48    | 66    | 49    | 81      | 45      | 50      | 64      | 62      | 65      | 61        | 47          | 82   | 79    | 81     |

### BAG-1

Bezüglich des Markers BAG-1 fallen bei Betrachtung der Mittelwerte (Tabelle 16) erneut ein Unterschied zwischen ERα positivem und negativem Gewebe auf. Wie bei Bcl-2 und WAF zeigen sich innerhalb der Subgruppenvergleiche G1 ERα positiv/G3 ERα negativ, G3 ERα positiv/G3 ERα negativ und Normalgewebe/G3 ERα negativ signifikante p-Werte, jedoch nicht innerhalb der G1/G3 oder Karzinomgewebe/Normalgewebe Testung (Tabelle 15).

Wie in Tabelle 39 zu sehen, besitzt fast jede untersuchte Probe eine Expression an BAG-1, mit fast keinem Unterschied zwischen Normal- und Karzinomgewebe.

**Tabelle 39** Anteil (in%) an positiven Proben (also positive Expression) für BAG-1 innerhalb der verschiedenen Subgruppen.

| positive Expressionen (%) |       |
|---------------------------|-------|
| Gesamt                    | 99,1  |
| G1 ERα positiv            | 100,0 |
| G3 ERα negativ            | 100,0 |
| G3 ERα positiv            | 100,0 |
| Alle ERα positiven Proben | 100,0 |
| Normalgewebe              | 96,8  |
| Karzinomgewebe            | 100,0 |

75% der Spleißvarianten sowie die PR-Isoformen und panPR lassen eine signifikante Korrelation mit dem Marker BAG-1 erkennen, stets mit positivem Spearman-Rho-Korrelationskoeffizienten mit geringer bis mittlerer Stärke. Keine Korrelation ergibt sich für PRΔ2, PRΔ3 und PRΔ3+4+5+6 (Tabelle 40).

**Tabelle 40** Korrelationsergebnisse zwischen Marker BAG-1 und den einzelnen PR-Spleißvarianten. Signifikante p-Werte wurden gelb markiert, die farbliche Kennzeichnung der Korrelationsstärke des Spearman-Rho-Koeffizienten richtet sich nach Bühl und Zöfel 2000 (Tabelle 13).

| BAG1           | PR Δ2 | PR Δ3 | PR Δ5 | PR Δ7 | PR i45a | PR i45b | PR Δ2+3 | PR Δ3+4 | PR Δ4+5 | PR Δ6+7 | PR Δ3+4+5 | PR Δ3+4+5+6 | PR B | PR AB | PR ABC |
|----------------|-------|-------|-------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----------|-------------|------|-------|--------|
| r <sub>s</sub> | 0,32  | -,02  | 0,58  | 0,43  | 0,55    | 0,30    | 0,56    | 0,47    | 0,50    | 0,52    | 0,44      | 0,21        | ,48  | ,47   | 0,49   |
| p              | 0,06  | 0,87  | 0,00  | 0,00  | 0,00    | 0,04    | 0,00    | 0,00    | 0,00    | 0,00    | 0,00      | 0,16        | ,00  | ,00   | 0,00   |
| N              | 36    | 48    | 66    | 49    | 81      | 45      | 50      | 64      | 62      | 65      | 61        | 47          | 82   | 79    | 81     |

## SCUBE-2

Bei SCUBE-2 (Signal peptide-complement proteins C1r/C1s, Uegf, and Bmp1-EGF domain-containing protein 2) sticht der deutlich hohe Mittelwert in der G1 ERα positiven Gruppe hervor (Tabelle 16). Es zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den meisten Subgruppen, jedoch nicht im Vergleich G1 ERα positiv/G3 ERα positiv, G3 ERα

positiv/Normalgewebe und Karzinom-/Normalgewebe (Tabelle 15). Innerhalb der G3 ER $\alpha$  negativen Gruppe ist ein sichtbar höherer Anteil an negativen Proben zu erkennen als in den ER $\alpha$  positiven Subgruppen. Sowohl im Normalgewebe als auch im Karzinomgewebe zeigt sich fast durchweg eine Expression von SCUBE-2 (Tabelle 41).

**Tabelle 41** Anteil (in%) an Expressionen für SCUBE-2 innerhalb der verschiedenen Subgruppen.

| positive Expressionen (%)         |       |
|-----------------------------------|-------|
| Gesamt                            | 94,0  |
| G1 ER $\alpha$ positiv            | 96,7  |
| G3 ER $\alpha$ negativ            | 80,8  |
| G3 ER $\alpha$ positiv            | 100,0 |
| Alle ER $\alpha$ positiven Proben | 98,3  |
| Normalgewebe                      | 96,8  |
| Karzinomgewebe                    | 92,9  |

Bis auf die Varianten PR $\Delta$ 2 und PR $\Delta$ 2+3 korrelieren alle Spleißvarianten mit der Expression des SCUBE-2. Es zeigen sich hierbei stets gleichgerichtete Zusammenhänge. Die PR-Isoformen sowie panPR besitzen sogar signifikante mittlere Korrelationsstärken (Tabelle 42).

**Tabelle 42** Korrelationsergebnisse zwischen Marker SCUBE-2 und den einzelnen PR-Spleißvarianten. Signifikante p-Werte wurden gelb markiert, die farbliche Kennzeichnung der Korrelationsstärke des Spearman-Rho-Koeffizienten richtet sich nach Bühl und Zöfel 2000 (Tabelle 13)

| SCUBE2         | PR $\Delta$ 2 | PR $\Delta$ 3 | PR $\Delta$ 5 | PR $\Delta$ 7 | PR i45a | PR i45b | PR $\Delta$ 2+3 | PR $\Delta$ 3+4 | PR $\Delta$ 4+5 | PR $\Delta$ 6+7 | PR $\Delta$ 3+4+5 | PR $\Delta$ 3+4+5+6 | PR B | PR AB | PR ABC |
|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------|---------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|---------------------|------|-------|--------|
| r <sub>s</sub> | 0,28          | 0,33          | 0,48          | 0,30          | 0,61    | 0,35    | 0,25            | 0,34            | 0,40            | 0,38            | 0,39              | 0,32                | ,64  | ,60   | 0,65   |
| p              | 0,09          | 0,02          | 0,00          | 0,04          | 0,00    | 0,02    | 0,08            | 0,01            | 0,00            | 0,00            | 0,00              | 0,03                | ,00  | ,00   | 0,00   |
| N              | 36            | 48            | 64            | 49            | 78      | 44      | 49              | 62              | 59              | 63              | 59                | 47                  | 76   | 74    | 77     |

### ***E-Cadherin***

E-Cadherin zeigt signifikante Unterschiede im Vergleich der Subgruppen G1 ER $\alpha$  positiv/G3 ER $\alpha$  negativ, G1 ER $\alpha$  positiv/Normalgewebe, G3 ER $\alpha$  negativ/G3 ER $\alpha$  positiv und G3 ER $\alpha$  positiv/Normalgewebe, jedoch nicht bei Vergleich der verschiedenen Grading-Gruppen (Tabelle 15). Auch in der Karzinomgruppe lässt sich ein signifikanter Unterschied zum Normalgewebe feststellen, wobei beide Gruppen fast ausschließlich positive Expressionen an E-Cadherin aufzeigen (Tabelle 43).

**Tabelle 43** Anteil (in%) an Expressionen für E-Cadherin innerhalb der verschiedenen Subgruppen.

| <b>positive Expressionen (%)</b>  |       |
|-----------------------------------|-------|
| Gesamt                            | 99,1  |
| G1 ER $\alpha$ positiv            | 100,0 |
| G3 ER $\alpha$ negativ            | 100,0 |
| G3 ER $\alpha$ positiv            | 100,0 |
| Alle ER $\alpha$ positiven Proben | 100,0 |
| Normalgewebe                      | 96,8  |
| Karzinomgewebe                    | 100,0 |

Signifikante Korrelationen zeigen sich bei der statistischen Analyse von E-Cadherin mit PR $\Delta$ 5, PRi45a, PR $\Delta$ 2+3, PR $\Delta$ 4+5, PR $\Delta$ 6+7, den Isoformen sowie panPR (Tabelle 44). Die Korrelationen sind stets gleichgerichtet. Kein Signifikantes Ergebnis ergeben die Varianten PR $\Delta$ 2, PR $\Delta$ 3, PR $\Delta$ 7, PRi45b, PR $\Delta$ 3+4, PR $\Delta$ 3+4+5 und PR $\Delta$ 3+4+5+6. PR $\Delta$ 3 erhält als einzige Variante einen negativen Korrelationskoeffizienten ohne Signifikanz (p 0.07) (Tabelle 44).

**Tabelle 44** Korrelationsergebnisse zwischen Marker E-Cadherin und den einzelnen PR-Spleißvarianten. Signifikante p-Werte wurden gelb markiert, die farbliche Kennzeichnung der Korrelationsstärke des Spearman-Rho-Koeffizienten richtet sich nach Bühler und Zöfel 2000 (Tabelle 13).

| E-Cadherin | PR Δ2 | PR Δ3 | PR Δ5 | PR Δ7 | PR i45a | PR i45b | PR Δ2+3 | PR Δ3+4 | PR Δ4+5 | PR Δ6+7 | PR Δ3+4+5 | PR Δ3+4+5+6 | PR B | PR AB | PR ABC |
|------------|-------|-------|-------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----------|-------------|------|-------|--------|
| $r_s$      | 0,22  | -,26  | 0,38  | 0,13  | 0,32    | 0,23    | 0,41    | 0,25    | 0,31    | 0,30    | 0,20      | 0,29        | ,32  | ,33   | 0,39   |
| <b>p</b>   | 0,19  | 0,07  | 0,00  | 0,37  | 0,00    | 0,13    | 0,00    | 0,05    | 0,02    | 0,02    | 0,13      | 0,05        | ,00  | ,00   | 0,00   |
| <b>N</b>   | 36    | 48    | 66    | 49    | 81      | 45      | 50      | 64      | 62      | 65      | 61        | 47          | 82   | 79    | 81     |

## PTEN

PTEN zeigt als einziger Marker seinen höchsten Mittelwert in der Normalgewebegruppe (Tabelle 16). Hierbei resultiert sogar ein signifikanter Unterschied zwischen den Karzinom- und Normalgewebeproben mit  $p < 0.01$ . Bis auf den Vergleich der ERα positiven Subgruppen, sowie den G3-Subgruppen weisen alle Subgruppenvergleiche signifikante p-Werte auf (Tabelle 15). Wiederum zeigt sich in fast allen getesteten Proben eine Expression (Tabelle 45).

**Tabelle 45** Anteil (in%) an Expressionen für PTEN innerhalb der verschiedenen Subgruppen.

| positive Expressionen (%) |       |
|---------------------------|-------|
| Gesamt                    | 98,3  |
| G1 ERα positiv            | 100,0 |
| G3 ERα negativ            | 100,0 |
| G3 ERα positiv            | 100,0 |
| Alle ERα positiven Proben | 100,0 |
| Normalgewebe              | 93,5  |
| Karzinomgewebe            | 100,0 |

Auch bei der statistischen Testung mittels Spearman-Rho werden signifikante gleichgerichtete Korrelationen mit fast allen Varianten festgestellt (Tabelle 46).

Ausgeschlossen sind PR $\Delta$ 2 und PR $\Delta$ 2+3, die keine Signifikanz aufweisen. Es zeigt sich also das gleiche Muster wie bei den Korrelationsergebnissen von SCUBE-2.

**Tabelle 46** Korrelationsergebnisse zwischen Marker PTEN und den einzelnen PR-Spleißvarianten. Signifikante p-Werte wurden gelb markiert, die farbliche Kennzeichnung der Korrelationsstärke des Spearman-Rho-Koeffizienten richtet sich nach Bühl und Zöfel 2000 (Tabelle 13).

| PTEN  | PR $\Delta$ 2 | PR $\Delta$ 3 | PR $\Delta$ 5 | PR $\Delta$ 7 | PR i45a | PR i45b | PR $\Delta$ 2+3 | PR $\Delta$ 3+4 | PR $\Delta$ 4+5 | PR $\Delta$ 6+7 | PR $\Delta$ 3+4+5 | PR $\Delta$ 3+4+5+6 | PR B | PR AB | PR ABC |
|-------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------|---------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|---------------------|------|-------|--------|
| $r_s$ | 0,25          | 0,57          | 0,40          | 0,48          | 0,60    | 0,51    | 0,21            | 0,25            | 0,34            | 0,58            | 0,58              | 0,46                | ,45  | ,46   | 0,46   |
| p     | 0,14          | 0,00          | 0,00          | 0,00          | 0,00    | 0,00    | 0,14            | 0,04            | 0,01            | 0,00            | 0,00              | 0,00                | ,00  | ,00   | 0,00   |
| N     | 36            | 8             | 65            | 49            | 81      | 45      | 50              | 64              | 62              | 65              | 61                | 47                  | 82   | 79    | 81     |

### GSTM-1

Die Subgruppenvergleiche G1 ER $\alpha$  positiv/G3 ER $\alpha$  negativ, G3 ER $\alpha$  positiv/G3 ER $\alpha$  negativ und Normalgewebe/G3 ER $\alpha$  negativ liefern signifikante Testergebnisse (Tabelle 15). Auch bei den Mittelwerten, hebt sich die G3 ER $\alpha$  negative Subgruppe mit einem deutlich niedrigeren Wert von den anderen Subgruppen ab (Tabelle 16). Vor allem die ER $\alpha$  Komponente scheinen bei dieser Betrachtung also wichtig. An positiven Expressionen ergeben sich für alle Subgruppen mit 75-80% ähnliche Anteile (Tabelle 47).

**Tabelle 47** Anteil (in%) an Expressionen für GSTM-1 innerhalb der verschiedenen Subgruppen.

| GSTM1: positive Expressionen (%)  |      |
|-----------------------------------|------|
| Gesamt                            | 80,2 |
| G1 ER $\alpha$ positiv            | 80,0 |
| G3 ER $\alpha$ negativ            | 76,9 |
| G3 ER $\alpha$ positiv            | 79,3 |
| Alle ER $\alpha$ positiven Proben | 79,7 |
| Normalgewebe                      | 83,9 |
| Karzinomgewebe                    | 78,8 |

Sowohl die Isoformen und der panPR als auch die Hälfte der Spleißvarianten zeigen eine positiv gerichtete signifikante Korrelation mit der GSTM-1 Expression. Zu diesen Varianten zählen PR $\Delta$ 2, PR $\Delta$ 5, PRi45a, PR $\Delta$ 3+4, PR $\Delta$ 6+7 und PR $\Delta$ 3+4+5 (Tabelle 48).

**Tabelle 48** Korrelationsergebnisse zwischen Marker GSTM-1 und den einzelnen PR-Spleißvarianten. Signifikante p-Werte wurden gelb markiert, die farbliche Kennzeichnung der Korrelationsstärke des Spearman-Rho-Koeffizienten richtet sich nach Bühl und Zöfel 2000 (Tabelle 13).

| GSTM1 | PR<br>$\Delta$ 2 | PR<br>$\Delta$ 3 | PR<br>$\Delta$ 5 | PR<br>$\Delta$ 7 | PR<br>i45a | PR<br>i45b | PR<br>$\Delta$ 2+3 | PR<br>$\Delta$ 3+4 | PR<br>$\Delta$ 4+5 | PR<br>$\Delta$ 6+7 | PR<br>$\Delta$ 3+4+5 | PR<br>$\Delta$ 3+4<br>+5+6 | PR<br>B | PR<br>AB | PR<br>ABC |
|-------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------|------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------------|---------|----------|-----------|
| $r_s$ | 0,50             | 0,03             | 0,37             | 0,31             | 0,49       | 0,29       | 0,19               | 0,37               | 0,27               | 0,31               | 0,41                 | 0,36                       | ,46     | ,43      | 0,49      |
| p     | 0,01             | 0,87             | 0,01             | 0,06             | 0,00       | 0,11       | 0,24               | 0,01               | 0,06               | 0,03               | 0,00                 | 0,04                       | ,00     | ,00      | 0,00      |
| N     | 29               | 34               | 51               | 38               | 64         | 33         | 39                 | 50                 | 48                 | 50                 | 48                   | 34                         | 65      | 61       | 64        |

### Gesamtdarstellung der Korrelation der PR-Spleißvarianten mit den verschiedenen Markern.

Zur besseren Veranschaulichung sind in den folgenden Tabellen die Korrelationsergebnisse der Spearman-Rho-Korrelation der einzelnen PR-Spleißvarianten mit den verschiedenen Markern in einer Gesamtübersicht dargestellt. In Tabelle 49 sind hierbei die Marker mit bekannter Assoziation zu Karzinomen zusammengefasst, wohingegen Tabelle 50 die Marker ohne Assoziation zeigt. Die Analyse erfolgte mittels Spearman-Rho-Korrelation, Signifikanzen sind gelb markiert.

**Tabelle 49** Korrelation der PR-Spleißvarianten mit "pro-Karzinom" Markern

|                      | Bcl-2 | STK15 | MYBL<br>2 | Cathe<br>psin-<br>L2 | Strom<br>elysin<br>3 | Ki67  | Cyclin<br>B1 | Her2-<br>neu | WAF   | GRB7  | CD68  | BAG1  |
|----------------------|-------|-------|-----------|----------------------|----------------------|-------|--------------|--------------|-------|-------|-------|-------|
| <b>PRΔ2</b>          |       |       |           |                      |                      |       |              |              |       |       |       |       |
| <b>r<sub>s</sub></b> | 0,31  | 0,13  | 0,72      | 0,20                 | 0,35                 | -0,05 | 0,13         | 0,58         | 0,12  | 0,12  | 0,07  | 0,32  |
| <b>p</b>             | 0,07  | 0,46  | 0,68      | 0,26                 | 0,04                 | 0,77  | 0,45         | 0,00         | 0,52  | 0,51  | 0,67  | 0,06  |
| <b>N</b>             | 35    | 36    | 36        | 32                   | 35                   | 33    | 35           | 36           | 29    | 34    | 36    | 36    |
| <b>PRΔ3</b>          |       |       |           |                      |                      |       |              |              |       |       |       |       |
| <b>r<sub>s</sub></b> | 0,32  | 0,17  | -0,14     | 0,17                 | -0,16                | 0,12  | 0,18         | -0,12        | -0,17 | -0,15 | -0,46 | -0,02 |
| <b>p</b>             | 0,03  | 0,25  | 0,34      | 0,27                 | 0,28                 | 0,45  | 0,22         | 0,44         | 0,29  | 0,34  | 0,00  | 0,87  |
| <b>N</b>             | 48    | 48    | 48        | 43                   | 47                   | 44    | 47           | 48           | 42    | 44    | 48    | 48    |
| <b>PRΔ5</b>          |       |       |           |                      |                      |       |              |              |       |       |       |       |
| <b>r<sub>s</sub></b> | 0,37  | -0,14 | -0,27     | -0,02                | -0,12                | -0,04 | -0,05        | 0,40         | 0,27  | 0,31  | 0,07  | 0,58  |
| <b>p</b>             | 0,00  | 0,28  | 0,03      | 0,90                 | 0,36                 | 0,76  | 0,70         | 0,00         | 0,06  | 0,02  | 0,58  | 0,00  |
| <b>N</b>             | 65    | 66    | 65        | 61                   | 59                   | 57    | 59           | 66           | 48    | 61    | 66    | 66    |
| <b>PRΔ7</b>          |       |       |           |                      |                      |       |              |              |       |       |       |       |
| <b>r<sub>s</sub></b> | 0,24  | 0,01  | -0,07     | 0,00                 | -0,06                | 0,15  | 0,36         | 0,20         | 0,12  | 0,06  | -0,03 | 0,43  |
| <b>p</b>             | 0,10  | 0,96  | 0,61      | 0,98                 | 0,69                 | 0,32  | 0,01         | 0,16         | 0,44  | 0,67  | 0,82  | 0,00  |
| <b>N</b>             | 49    | 49    | 49        | 43                   | 47                   | 46    | 47           | 49           | 41    | 47    | 49    | 49    |
| <b>PR i45a</b>       |       |       |           |                      |                      |       |              |              |       |       |       |       |
| <b>r<sub>s</sub></b> | 0,48  | -0,13 | -0,35     | -0,14                | 0,11                 | -0,10 | 0,00         | 0,23         | 0,18  | 0,08  | 0,14  | 0,55  |
| <b>p</b>             | 0,00  | 0,24  | 0,00      | 0,26                 | 0,34                 | 0,40  | 0,98         | 0,04         | 0,15  | 0,49  | 0,22  | 0,00  |
| <b>N</b>             | 80    | 81    | 81        | 71                   | 79                   | 77    | 78           | 81           | 64    | 77    | 81    | 81    |
| <b>PR i45b</b>       |       |       |           |                      |                      |       |              |              |       |       |       |       |
| <b>r<sub>s</sub></b> | 0,62  | -0,02 | -0,01     | 0,08                 | 0,26                 | 0,08  | -0,07        | 0,41         | 0,15  | 0,25  | 0,04  | 0,30  |
| <b>p</b>             | 0,00  | 0,88  | 0,94      | 0,61                 | 0,09                 | 0,60  | 0,64         | 0,01         | 0,37  | 0,11  | 0,79  | 0,04  |
| <b>N</b>             | 45    | 45    | 45        | 40                   | 44                   | 43    | 45           | 45           | 40    | 44    | 45    | 45    |
| <b>PRΔ2+3</b>        |       |       |           |                      |                      |       |              |              |       |       |       |       |
| <b>r<sub>s</sub></b> | 0,36  | 0,00  | -0,03     | -0,22                | 0,14                 | 0,06  | 0,01         | 0,31         | 0,17  | 0,09  | 0,37  | 0,56  |
| <b>p</b>             | 0,01  | 0,99  | 0,86      | 0,16                 | 0,35                 | 0,69  | 0,95         | 0,03         | 0,28  | 0,53  | 0,01  | 0,00  |
| <b>N</b>             | 49    | 50    | 50        | 43                   | 48                   | 48    | 49           | 50           | 41    | 49    | 50    | 50    |



|                      |      |       |       |       |       |       |       |      |       |       |      |      |
|----------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|------|------|
| <b>PRΔ3+4</b>        |      |       |       |       |       |       |       |      |       |       |      |      |
| <b>r<sub>s</sub></b> | 0,27 | -0,09 | -0,21 | -0,23 | -0,12 | -0,08 | 0,06  | 0,14 | 0,14  | -0,08 | 0,10 | 0,47 |
| <b>p</b>             | 0,03 | 0,47  | 0,09  | 0,09  | 0,37  | 0,54  | 0,64  | 0,26 | 0,31  | 0,57  | 0,42 | 0,00 |
| <b>N</b>             | 64   | 64    | 64    | 57    | 62    | 60    | 61    | 64   | 54    | 60    | 64   | 64   |
| <b>PRΔ4+5</b>        |      |       |       |       |       |       |       |      |       |       |      |      |
| <b>r<sub>s</sub></b> | 0,40 | -0,13 | -0,28 | -0,12 | 0,07  | -0,06 | -0,04 | 0,27 | 0,24  | 0,16  | 0,18 | 0,50 |
| <b>p</b>             | 0,00 | 0,32  | 0,03  | 0,40  | 0,60  | 0,64  | 0,78  | 0,03 | 0,09  | 0,23  | 0,16 | 0,00 |
| <b>N</b>             | 62   | 62    | 62    | 56    | 60    | 58    | 60    | 62   | 51    | 58    | 62   | 62   |
| <b>PRΔ6+7</b>        |      |       |       |       |       |       |       |      |       |       |      |      |
| <b>r<sub>s</sub></b> | 0,28 | -0,08 | -0,33 | -0,30 | 0,01  | -0,17 | -0,06 | 0,28 | 0,22  | -0,03 | 0,05 | 0,52 |
| <b>p</b>             | 0,02 | 0,55  | 0,01  | 0,02  | 0,92  | 0,19  | 0,67  | 0,03 | 0,10  | 0,81  | 0,69 | 0,00 |
| <b>N</b>             | 64   | 65    | 65    | 57    | 63    | 61    | 63    | 65   | 56    | 61    | 65   | 65   |
| <b>PRΔ3+4+5</b>      |      |       |       |       |       |       |       |      |       |       |      |      |
| <b>r<sub>s</sub></b> | 0,37 | -0,08 | -0,35 | -0,26 | 0,00  | -0,12 | 0,02  | 0,20 | -0,04 | 0,00  | 0,01 | 0,44 |
| <b>p</b>             | 0,00 | 0,53  | 0,01  | 0,05  | 0,98  | 0,39  | 0,88  | 0,12 | 0,81  | 0,98  | 0,93 | 0,00 |
| <b>N</b>             | 60   | 61    | 61    | 56    | 61    | 57    | 59    | 61   | 51    | 57    | 61   | 61   |
| <b>PRΔ3+4+5+6</b>    |      |       |       |       |       |       |       |      |       |       |      |      |
| <b>r<sub>s</sub></b> | 0,21 | 0,03  | -0,06 | 0,05  | -0,11 | -0,01 | 0,24  | 0,10 | 0,19  | 0,01  | 0,22 | 0,21 |
| <b>P</b>             | 0,15 | 0,86  | 0,69  | 0,77  | 0,46  | 0,96  | 0,11  | 0,51 | 0,23  | 0,93  | 0,14 | 0,16 |
| <b>N</b>             | 47   | 47    | 47    | 41    | 46    | 44    | 46    | 47   | 43    | 45    | 47   | 47   |
| <b>panPR</b>         |      |       |       |       |       |       |       |      |       |       |      |      |
| <b>r<sub>s</sub></b> | 0,46 | -0,24 | -0,30 | -0,10 | 0,22  | -0,10 | -0,07 | 0,24 | 0,23  | 0,13  | 0,10 | 0,49 |
| <b>p</b>             | 0,00 | 0,03  | 0,01  | 0,39  | 0,05  | 0,38  | 0,52  | 0,03 | 0,07  | 0,25  | 0,38 | 0,00 |
| <b>N</b>             | 80   | 81    | 81    | 71    | 79    | 77    | 78    | 81   | 63    | 77    | 81   | 81   |

Tabelle 50 Korrelation der PR-Splicevarianten mit "contra-Karzinom" Markern

|                      | SCUBE2 | E-Cadherin | PTEN | GSTM1 |
|----------------------|--------|------------|------|-------|
| <b>PRΔ2</b>          |        |            |      |       |
| <b>r<sub>s</sub></b> | 0,28   | 0,22       | 0,25 | 0,50  |
| <b>p</b>             | 0,09   | 0,19       | 0,14 | 0,01  |
| <b>N</b>             | 36     | 36         | 36   | 29    |
| <b>PRΔ3</b>          |        |            |      |       |
| <b>r<sub>s</sub></b> | 0,33   | -0,26      | 0,57 | 0,03  |
| <b>p</b>             | 0,02   | 0,07       | 0,00 | 0,87  |
| <b>N</b>             | 48     | 48         | 8    | 34    |
| <b>PRΔ5</b>          |        |            |      |       |
| <b>r<sub>s</sub></b> | 0,48   | 0,38       | 0,40 | 0,37  |
| <b>p</b>             | 0,00   | 0,00       | 0,00 | 0,01  |
| <b>N</b>             | 64     | 66         | 65   | 51    |
| <b>PRΔ7</b>          |        |            |      |       |
| <b>r<sub>s</sub></b> | 0,30   | 0,13       | 0,48 | 0,31  |
| <b>p</b>             | 0,04   | 0,37       | 0,00 | 0,06  |
| <b>N</b>             | 49     | 49         | 49   | 38    |

**PRi45a**

|       |      |      |      |      |
|-------|------|------|------|------|
| $r_s$ | 0,61 | 0,32 | 0,60 | 0,49 |
| $p$   | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| $N$   | 78   | 81   | 81   | 64   |

**PRi45b**

|       |      |      |      |      |
|-------|------|------|------|------|
| $r_s$ | 0,35 | 0,23 | 0,51 | 0,29 |
| $p$   | 0,02 | 0,13 | 0,00 | 0,11 |
| $N$   | 44   | 45   | 45   | 33   |

**PRΔ2+3**

|       |      |      |      |      |
|-------|------|------|------|------|
| $r_s$ | 0,25 | 0,41 | 0,21 | 0,19 |
| $p$   | 0,08 | 0,00 | 0,14 | 0,24 |
| $N$   | 49   | 50   | 50   | 39   |

**PRΔ3+4**

|       |      |      |      |      |
|-------|------|------|------|------|
| $r_s$ | 0,34 | 0,25 | 0,25 | 0,37 |
| $p$   | 0,01 | 0,05 | 0,04 | 0,01 |
| $N$   | 62   | 64   | 64   | 50   |

**PRΔ4+5**

|       |      |      |      |      |
|-------|------|------|------|------|
| $r_s$ | 0,40 | 0,31 | 0,34 | 0,27 |
| $p$   | 0,00 | 0,02 | 0,01 | 0,06 |
| $N$   | 59   | 62   | 62   | 48   |

**PRΔ6+7**

|       |      |      |      |      |
|-------|------|------|------|------|
| $r_s$ | 0,38 | 0,30 | 0,58 | 0,31 |
| $p$   | 0,00 | 0,02 | 0,00 | 0,03 |
| $N$   | 63   | 65   | 65   | 50   |

**PRΔ3+4+5**

|       |      |      |      |      |
|-------|------|------|------|------|
| $r_s$ | 0,39 | 0,20 | 0,58 | 0,41 |
| $p$   | 0,00 | 0,13 | 0,00 | 0,00 |
| $N$   | 59   | 61   | 61   | 48   |

**PRΔ3+4+5+6**

|       |      |      |      |      |
|-------|------|------|------|------|
| $r_s$ | 0,32 | 0,29 | 0,46 | 0,36 |
| $p$   | 0,03 | 0,05 | 0,00 | 0,04 |
| $N$   | 47   | 47   | 47   | 34   |

**panPR**

|       |      |      |      |      |
|-------|------|------|------|------|
| $r_s$ | 0,65 | 0,39 | 0,46 | 0,49 |
| $p$   | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| $N$   | 77   | 81   | 81   | 64   |

### 5.7 „Matched Pairs“

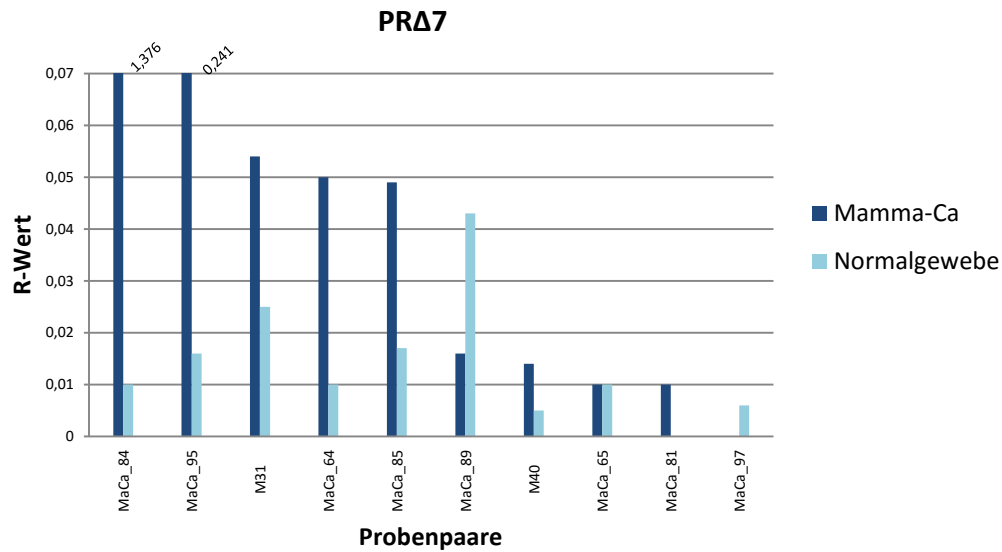
Die Untersuchung der „Matched Pairs“ erfolgte mittels nonparametrischem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben zur Analyse der zentralen Tendenz von Rangdifferenzen im Vergleich von 27 Mammakarzinom- und dazugehörigen Normalgewebeproben. Hierdurch kann ein möglicher Unterschied in der Expressionsstärke untersucht werden. Es wurden jeweils eine Karzinom- und eine Normalgewebeprobe derselben Patientin verglichen. Miteinbezogen wurden ausschließlich Werte mit positiver Schmelzkurve.

Signifikante Ergebnisse zeigen sich im Hinblick auf die Spleiß-Varianten

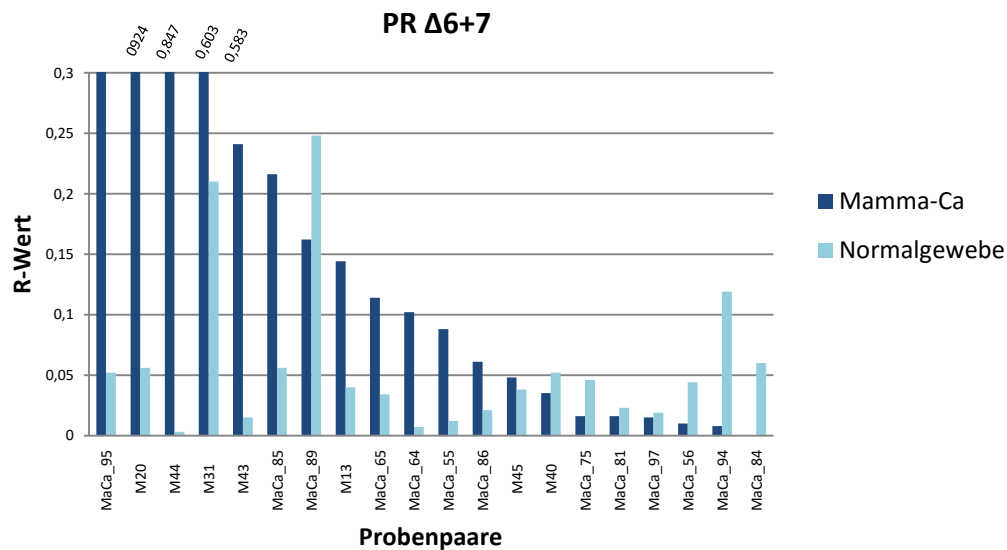
PR $\Delta$ 7 ( $z = -2.073$ ,  $p = 0.0382$ ) und PR $\Delta$ 6+7 ( $z = -2.173$ ,  $p = 0.0298$ ) sowie die Isoformen PR-B ( $z = -2.062$ ,  $p = 0.0392$ ) und PR-AB ( $z = -2.346$ ,  $p = 0.019$ ).

Diese Varianten unterscheiden sich also signifikant in ihrer zentralen Tendenz des Expressionverhaltens zwischen den Karzinom- und Normalgewebeproben. Beide Spleißvarianten, die ein signifikantes Ergebnis in der Wilcoxon-Testung zeigen, weisen eine Deletion des Exons 7 auf.

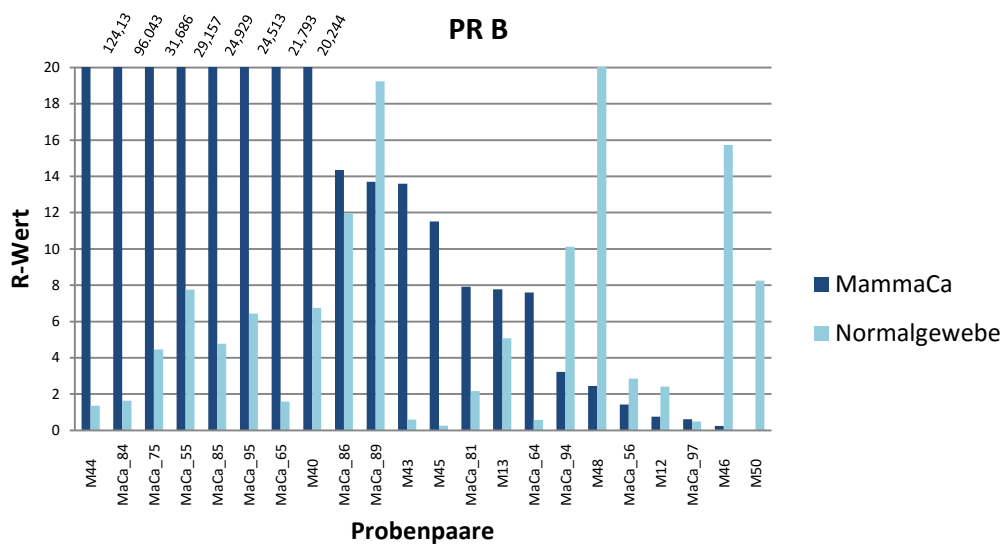
Die folgenden Diagramme (Abbildung 13 bis Abbildung 16) zeigen die Verteilung der R-Werte innerhalb der „Matched Pairs“ der jeweiligen PR-Spleißvariante. Hierbei sind bei den Mammakarzinom-Proben in den meisten Fällen deutlich höhere Werte als bei den Normalgewebeproben zu sehen.



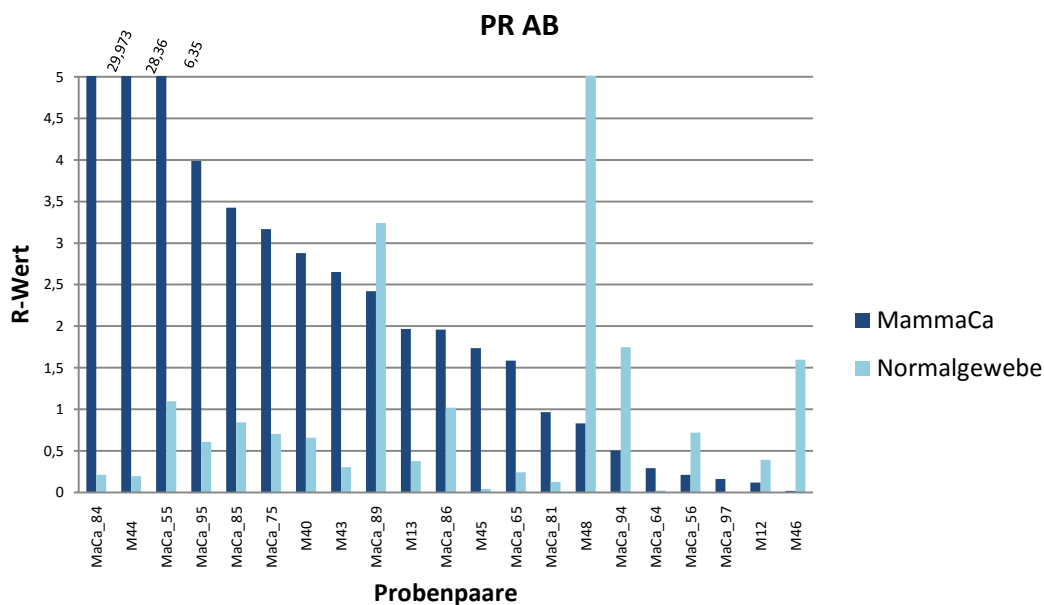
**Abbildung 13** Wilcoxon-Test der untersuchten "matched pairs" für die Spleißvariante PRΔ7. Die statistische Auswertung ergab einen z-Wert von -2.073 mit einer Signifikanz von  $p = 0.038$ . Bei 70% der Paare gilt  $R$  (Mammakarzinom)  $>$   $R$  (Normalgewebe).



**Abbildung 14** Wilcoxon-Test der untersuchten "matched pairs" für die Spleißvariante PRΔ6+7. Die statistische Auswertung ergab einen z-Wert von -2.173 mit einer Signifikanz von  $p = 0.03$ . Bei 63% der Paare gilt  $R$  (Mammakarzinom)  $>$   $R$  (Normalgewebe).



**Abbildung 15** Wilcoxon-Test der untersuchten "matched pairs" für die Isoform PR B. Die statistische Auswertung ergab einen z-Wert von -2.062 mit einer Signifikanz von  $p = 0.039$ . Bei 68% der Paare gilt  $R$  (Mammakarzinom)  $> R$  (Normalgewebe).



**Abbildung 16** Wilcoxon-Test der untersuchten "matched pairs" für PR AB. Die statistische Auswertung ergab einen z-Wert von -2.346 mit einer Signifikanz von  $p = 0.019$ . Bei 71% der Paare gilt  $R$  (Mammakarzinom)  $> R$  (Normalgewebe).

## 6. Diskussion

Wie bereits in Kapitel 1 erläutert, stellt das Mammakarzinom die häufigste Krebserkrankung des weiblichen Geschlechts dar (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2012).

Die Therapie des Mammakarzinoms gliedert sich in verschiedene Säulen und wird individuell an die Eigenschaften des Karzinoms der jeweiligen Patientin angepasst. Eine wichtige Rolle in der Therapie spielen unter anderem endokrine Angriffsmöglichkeiten, z.B. Aromatasehemmer, selektive Östrogenrezeptormodulatoren sowie Antiprogesterone (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF et al. 2012).

Zu diesem Zweck werden prädiktive Faktoren ermittelt, denen eine Vorhersagekraft bezüglich des Ansprechens auf eine endokrine Therapie zugesprochen wird. Hierzu zählen der Hormonrezeptorstatus, der Her2neu-Status sowie die Expression verschiedener Proliferationsmarker (z.B. Ki-67) (Kreienberg 2010). Im Hinblick auf den Hormonrezeptorstatus wurden dem Progesteronrezeptor im Laufe der Zeit zunehmend prädiktive Eigenschaften zugestanden (Ravdin et al. 1992; Bardou 2003, 2003; Hammond et al. 2010).

Bei der Bestimmung des Progesteronrezeptorstatus werden derzeit leitliniengerecht immunhistochemische Analysen (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF et al. 2012) mittels spezifischer N-Terminus-gerichteter Antikörper angewandt. Diese können jedoch weder die Isoformen noch verschiedene Spleißvarianten des Progesteronrezeptors unterscheiden (Richer et al. 1998; Cork et al. 2012).

Da bereits zahlreiche Progesteronrezeptor-Spleißvarianten bekannt sind, wurde in der vorliegenden Arbeit Brustkrebsgewebe mittels real time-PCR auf die Expression verschiedener Spleißvarianten in bestimmten Profilmustern untersucht. Von Interesse war dabei auch der ER $\alpha$  Status, da die Transkription des Progesteronrezeptors als östrogenabhängig gilt (Kastner et al. 1990; Cork et al. 2012).

Im Verlauf der Ausarbeitung dieser Arbeit wurden daher drei Subgruppen an Karzinomgewebe (G1 ER $\alpha$  positives, G3 ER $\alpha$  positives und G3 ER $\alpha$  negatives Gewebe) sowie gesundes Brustgewebe untersucht. Somit konnte die Bedeutung des ER-Status

sowie des Gradings, die ebenfalls zu den Prognose- und Prädiktionsfaktoren zählen, in Verbindung mit den Progesteronezeptor-Spleißvarianten analysiert werden. Des Weiteren wurde ein Vergleich von „Matched Pairs“ aus Mammakarzinom- und Normalgewebe vorgenommen, um eine mögliche Krebsgewebsspezifität einzelner Spleißvarianten detektieren zu können.

In der Literatur sind bestimmte biologische Marker beschrieben, die ein spezifisches Verhalten innerhalb von Krebsgewebe aufweisen und eine Aussage über zum Beispiel die Aggressivität oder Prognose von Tumoren ermöglichen. Daher wurde eine Korrelation von Markern mit verschiedenen Spleißvarianten vermutet und in der vorliegenden Arbeit untersucht.

### **6.1 Expressionsprofile der Spleißvarianten**

In den vorliegenden Untersuchungen wurden 30 G1 ER $\alpha$  positive, 26 G3 ER $\alpha$  negative, 29 G3 ER $\alpha$  positive sowie 31 Proben aus gesundem Brustgewebe mittels real time-PCR auf die Expression verschiedener PR-Spleißvarianten hin untersucht. Innerhalb der ER $\alpha$  positiven Subgruppe konnte eine deutlich höhere Anzahl an Expressionen verschiedener Spleißvarianten detektiert werden als in ER $\alpha$  negativem Gewebe (Abbildung 6 bis Abbildung 9). Dies lässt sich auf eine ER-abhängigen Transkription des Progesteronrezeptorgens zurückführen, wie sie bereits in der Literatur beschrieben wurde (Horwitz und McGuire 1975).

Auffällig ist jedoch, dass sich in rund dreiviertel (76,5%) der immunhistochemisch als ER $\alpha$  negativ klassifizierten Karzinomgeweben in dieser Arbeit eine Expression an panER $\alpha$  mittels real time-PCR nachweisen lässt. Innerhalb der immunhistochemisch ER $\alpha$  positiven Gewebe zeigt sich auch mittels real time-PCR eine panER $\alpha$  Expression in 98,3% der Fälle. Es wurde bereits eine Vielzahl an ER $\alpha$ -Spleißvarianten (Poola und Speirs 2001; McGuire et al. 1991) beschrieben, die jedoch nicht mit den immunhistochemisch angewandten Antikörpern detektiert werden können. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete panER $\alpha$ -Primer könnte solche Varianten miterfasst haben. Weitergehend ist zu berücksichtigen, dass bei der Unterteilung in eine ER $\alpha$  negative Subgruppe die Proteinebene untersucht wurde und diese nicht mit der

Genexpression gleichgesetzt werden kann. Möglich wären daher Faktoren, die einen Einfluss auf die Proteintranslation der transkribierten Gene haben.

Andere Studien beschrieben bereits einen geringen Anteil an ER negativen/PR positiven Tumoren (Osborne 1998; Hewitt und Korach 2000), für die ein besseres Ansprechen auf eine Hormontherapie als für ER negative/PR negative Tumoren gezeigt werden konnte (Osborne et al. 2005). Auch in dieser Arbeit konnten im Expressionsprofil der als ER $\alpha$  negativ klassifizierten Geweben PR-Expressionen gefunden werden (Abbildung 7), sowohl des panPR als auch einzelner Spleißvarianten. Die Transkription der PR-Spleißvarianten könnte also ebenso durch ER-unabhängige Faktoren bedingt und damit auch in Abwesenheit von ER aktiv sein, wie es bereits für den PR nachgewiesen wurde (Giulianelli et al. 2012).

Dem ER/PR Status kommt bei der Behandlung von Brustkrebspatientinnen eine große Bedeutung zu. So wird einem ER positiven/PR positiven Tumor ein besseres Ansprechen auf eine endokrine Therapie zugesprochen als einem PR negativen Tumor. Dennoch wurden auch PR negative Tumoren nachgewiesen, die von einer endokrinen Therapie profitierten und bei denen eine bleibende Aktivität des ER trotz PR-Negativität erfasst wurde (Osborne et al. 2005). Die Hypothese, dass ein PR negativer Tumor einen nicht-funktionierenden ER beinhalte, musste damit überdacht werden. Bereits in früheren Studien konnte auch innerhalb von PR negativ klassifiziertem Gewebe solche PR-Spleißvarianten nachgewiesen werden (Cork et al. 2012). Eine Untersuchung der Patientinnen auf die PR-Spleißvarianten hin könnte somit eine Optimierung der prädiktiven Aussage des Hormonrezeptorstatus erzielen. Dem Progesteronrezeptor wird ein unabhängiger prädiktiver und prognostischer Wert zugesprochen (Ravdin et al. 1992; Bardou 2003), sodass eine genauere Klassifizierung von Vorteil sein dürfte. Viele Studien untersuchten bisher eine Korrelation zwischen verschiedenen Risikofaktoren mit dem ER/PR-Status (Kreiger et al. 1991; Potter et al. 1995; Colditz et al. 2004). Die Ergebnisse müssten bei Beachtung der Expression von Progesteronrezeptor-Spleißvarianten möglicherweise neu definiert werden.

Die Variante PRi45a zeigt im Gegensatz zu den anderen Varianten einen recht ausgeprägten Anteil an positiven Proben (76,9%) innerhalb der ER $\alpha$ -negativen



Subgruppe. Eine überwiegend ER $\alpha$ -unabhängige Transkription des PRi45a wäre daher denkbar. PRi45a zeichnet sich durch eine Exoninsertion zwischen Exon 4 und Exon 5 aus (Yamanaka et al. 2002). Da diese Variante eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem Protein von PR $\Delta$ 6 aufweist, könnte PR i45a laut Literatur ebenso eine inhibitorische Wirkung auf die Isoformen PR A und B besitzen (Hirata et al. 2002a). Da sich in der vorliegenden Arbeit eine Übereinstimmung der Verteilung im Expressionsprofil des PRi45a und des PR-B zeigt, kann eine Suppression auf genetischer Basis durch die vorliegende Arbeit nicht bestätigt werden (Abbildungen 3-6 und Tabelle 9). Eine inhibitorische Wirkung auf Proteinebene kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

## 6.2 Codierung der Expressionsprofile

Bei der Codierung der Expressionsprofile der einzelnen Mammakarzinom-Proben (siehe Kapitel 5.2) konnte lediglich ein gehäuftes Auftreten der Kombination aller Spleißvarianten in den ER $\alpha$  positiven Proben nachgewiesen werden. Möglicherweise war die Anzahl der untersuchten Proben (85 Karzinomproben) zu gering, um relevante Profile erkennen zu können. Unter Umständen könnte eine definierte Gruppierung der Karzinomproben nach verschiedenen zusätzlichen Merkmalen, wie Alter der Patientin oder Menopausenstatus, mehr gemeinsame Expressionsprofile verzeichnen. Dass dieses Profil nur in den ER $\alpha$  positiven Geweben zu finden war, lässt sich mit dem allgemeinen Überwiegen von PR-Spleißvarianten in ER $\alpha$  positivem im Gegensatz zu ER $\alpha$  negativem Gewebe in Einklang bringen. Auch ohne einheitliche Profile könnten einzelne Spleißvarianten eine besondere Rolle im Verhalten der Tumoren spielen. Um das Verhalten dieser Spleißvarianten jedoch genauer untersuchen zu können, sind ebenso Studien zur Analyse der Expression solcher Spleißvarianten auf Proteinebene notwendig.

### 6.3 Subgruppenvergleiche

Die ER $\alpha$  positiven Subgruppen zeigen in der Regel eine signifikant höhere Expression an PR-Spleißvarianten im Vergleich zu den ER $\alpha$  negativen Gewebe. Dies könnte sich, wie bereits bei den Expressionsprofilen erwähnt, auf eine östrogenabhängige Transkription von PR zurückführen lassen (Horwitz und McGuire 1975). In den Vergleichen der G1 und G3 Gruppen lassen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen. Die Stärke der Expression der Spleißvarianten scheint also unabhängig vom Grading der Tumoren zu sein. Andere Forschungsergebnisse zeigen jedoch eine inverse Korrelation zwischen dem ER $\alpha$ /PR-Status und Tumor-Grading (Jovicić-Milentijević et al. 2004; Atchley et al. 2008; Graeser et al. 2009). Wichtig ist auch hier zu beachten, dass in der vorliegenden Arbeit stets nur Werte der positiven Proben einbezogen wurden.

### 6.4 Korrelation der einzelnen PR-Spleißvarianten mit panPR

Die panPR Variante wurde mittels eines Primers erfasst, der die Isoformen des Progesteronrezeptors erkennt. Im Test der einzelnen PR-Spleißvarianten zeigt sich stets eine gleichgerichtete signifikante Korrelation mit panPR. Dies bedeutet, dass Proben mit höherer Expression einer Variante auch eine höhere Expression von panPR zeigen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei zunehmender Anzahl der Transkripte des PR-Gens auch das alternative Spleißen hochreguliert wird, sodass mehr Varianten nachzuweisen sind. PR Varianten scheinen schließlich durch alternatives Spleißen der primären Transkripte der wildtype-PR zu entstehen (Misao et al. 1998). Beachtet werden muss jedoch, dass nur positive Schmelzkurven in die Korrelation einbezogen wurden. Allerdings werden nicht alle Varianten zu 100% von den Gewebeproben exprimiert (siehe Expressionsprofile Abbildung 3-6). Bei einer hohen Expression von panPR kann also nicht generell von einer Expression der verschiedenen Spleißvarianten ausgegangen werden. Dies deutet auf das Vorhandensein unterschiedlicher Faktoren hin, die Einfluss auf das alternative Spleißen haben, wie es bereits in zahlreiche Studien propagiert wurde (Alló et al. 2009; Black 2003; Witten und Ule 2011).

### 6.5 Korrelation der einzelnen PR-Spleißvarianten mit panER $\alpha$

In den vorliegenden Ergebnissen kann eine deutliche Assoziation der PR-Varianten mit der Expression von panER $\alpha$  nachgewiesen werden (Tabelle 10). Alle signifikanten Korrelationen sind gleichgerichtet, sodass eine erhöhte Expression von panER $\alpha$  mit einer erhöhten Expression der PR-Spleißvarianten einhergeht. In welcher Richtung sich die Variablen bedingen, kann durch die Korrelation jedoch nicht festgestellt werden.

Bereits für PR wurde eine östrogenabhängige Transkription postuliert (Horwitz und McGuire 1975; Kastner et al. 1990). In den erstellten Expressionsprofilen dieser Arbeit (Abbildung 6 bis 8) ist ein Überwiegen der Expressionen der PR-Varianten im ER $\alpha$  positiven Gewebe zu sehen. Es könnte also eine Beeinflussung der alternativen Spleiß-Events, z.B. durch Regulation der Spleiß-Faktoren durch ER $\alpha$  erfolgen, die auch bereits für andere Genexpressionen nachgewiesen wurde (Zhang et al. 2007; Zhu et al. 2005).

Durch Giulianelli et al. wurde eine Interaktion zwischen ER $\alpha$  und den PR-Isoformen auf Promotorebene festgestellt, die zur verstärkten Progestin-abhängigen Proliferation innerhalb von Brustkrebsgewebe führt (Giulianelli et al. 2012). Eine derartige Interaktion ließe sich ebenso für die PR-Spleißvarianten vermuten. Während in der Literatur eine Downregulation der ER $\alpha$  Expression durch PR-B beschrieben wurde (Amicis et al. 2009), zeigt sich in der vorliegenden Untersuchung eine signifikante gleichgerichtete Korrelation mit einer mittleren Korrelationsstärke von  $r_s = 0,649$  ( $p = 0.000$ ). Da die Expression auf cDNA-Ebene gemessen wurde, könnte dennoch eine Downregulation posttranskriptionell auf Proteinebene stattfinden, die sich hier folglich nicht darstellen lässt.

## 6.6 Korrelation der PR-Spleißvarianten mit verschiedenen Markern

Zur besseren Veranschaulichung wird im folgenden Kapitel auf jeden Marker einzeln eingegangen. Es wird seine Bedeutung in der Literatur, die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit sowie die Diskussion dieser Ergebnisse im Zusammenhang mit anderen Forschungsergebnissen erläutert.

### ***Bcl-2***

Bcl-2 ist ein bekanntes Protoonkogen (Youle und Strasser 2008), das eine Expression bei ca. 40-80% der Brustkrebspatientinnen aufweist und auch in anderen Krebsgeweben aufzufinden ist (Yip und Reed 2008).

Bcl-2 zeigt in den vorliegenden Korrelationen eine signifikant höhere Expression in den ER $\alpha$  positiven Gewebeproben im Vergleich zu den ER $\alpha$  negativen Proben. Dies lässt eine Interaktion zwischen dem Östrogenrezeptor bzw. dessen Signalwegen und von Bcl-2 vermuten.

Bereits in anderen Forschungsergebnissen wurde von einer Assoziation zwischen der Expression von Bcl-2 und der Expression der Hormonrezeptoren berichtet. Bcl-2 galt dabei als Marker für eine gute Prognose (Daidone et al. 1999; Silvestrini et al. 1996; Callagy et al. 2008; Dawson et al. 2010). Folgend wird vermutet, dass die Expression von Bcl-2 durch den Einfluss von Östrogenen reguliert werden könnte (Malamou-Mitsi et al. 2006; Gee et al. 1994). Durch die Hormonbindung an den Östrogenrezeptor wird die Transkription von verschiedenen östrogenabhängigen Genen aktiviert, darunter auch die des PR (Linke et al. 2006).

Bei der Spearman-Rho-Korrelation stellen sich in dieser Arbeit signifikante Ergebnisse in der Korrelation des Bcl-2 mit den Varianten PR $\Delta$ 3, PR $\Delta$ 5, PRi45a, PRi45b, PR $\Delta$ 2+3, PR $\Delta$ 3+4, PR $\Delta$ 4+5, PR $\Delta$ 6+7, PR $\Delta$ 3+4+5 und den Isoformen sowie dem panPR mit jeweils gleichgerichtetem Zusammenhang dar. Für den PR wurde bereits eine Assoziation mit Bcl-2 beschrieben. Bei ER-positiven Patientinnen, die sowohl PR als auch Bcl-2 exprimierten, konnte bereits ein besseres Outcome festgestellt werden. Hingegen unterschieden sich ER positive Patientinnen ohne PR oder Bcl-2 nicht

signifikant von den ER negativen Patientinnen (Linke et al. 2006). Diese Beobachtung hebt die Bedeutung des Zusammenhanges von PR und Bcl-2 hervor. Da sich in den vorliegenden Ergebnissen eine Korrelation zwischen Bcl-2 und einigen Spleißvarianten zeigt, könnten diese Kombinationen ebenfalls einen Einfluss auf das Outcome und die Prognose der Patientinnen haben, auch wenn diese zum Beispiel immunhistochemisch als PR negativ klassifiziert würden.

Da sowohl die Expression des PR (Kastner et al. 1990) als auch die des Bcl-2 (Perillo et al. 2000) östrogenabhängig zu sein scheint, könnten beide als Marker für einen intakten Östrogen-Signalweg dienen und das Ansprechen auf eine Antiöstrogene Therapie mit Tamoxifen möglicherweise besser vorhersagen. Dem PR wurde bereits ein solcher prädiktiver Wert zugesprochen (Osborne et al. 2005; Ravdin et al. 1992).

**STK-15**

STK-15 ist ein weiteres beschriebenes Onkogen, welches häufig in Brustkrebszellen überexprimiert wird und mit einer schlechteren Prognose assoziiert zu sein scheint. STK-15 beschreibt eine Centrosom-assoziierte Kinase, welche in Mammakarzinomzellen zu einer Überexpression von Centrosomen und einer chromosomalen Instabilität zu führen scheint (Sen et al. 1997; Zhou et al. 1998).

In der vorliegenden Arbeit ist ein signifikanter Unterschied der Expressionswerte für STK-15 im Vergleich der Karzinom- mit den Normalgeweben festzustellen, mit höherer Expression im Karzinomgewebe. Dies scheint seine Rolle als Onkogen zu bestätigen.

Ebenso stellt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der G1- und der G3-Gruppe dar, mit höherem Mittelwert innerhalb der G3-Gruppe. Dies unterstützt die Hypothese, dass es sich bei STK-15 um einen Marker für ein aggressiveres, fortgeschrittenes Tumorstadium handelt, wie es bereits in anderen Studien erwähnt wurde (Miyoshi et al. 2001; Siggelkow et al. 2012). Im Vergleich der ER $\alpha$  positiven mit den ER $\alpha$  negativen Gewebe ist kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen.

Weiterhin lässt sich in eine negative Korrelation der PR-Isoformen mit dem Marker STK-15 nachweisen. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Studien überein, in denen ebenfalls eine inverse Korrelation mit den Östrogen- und Progesteronrezeptoren beschrieben wurde (Miyoshi et al. 2001). Da die Hormonrezeptoren prädiktive Parameter für das Ansprechen auf eine endokrine Therapie darstellen, könnte eine Überexpression an STK-15 für eine Resistenz sprechen (Miyoshi et al. 2001). Möglicherweise könnten die Progesteronrezeptor-Spleißvarianten diese Hypothese widerlegen, da in dieser Arbeit keine signifikante Assoziation zwischen STK-15 und den untersuchten PR-Spleißvarianten gefunden werden konnte, sodass sich diese von den PR-Isoformen abgrenzen lassen. Es wäre möglich, dass Zellen mit Expression der Spleißvarianten dennoch auf eine endokrine Therapie ansprechen. Zur genaueren Untersuchung des endokrinen Ansprechens wären weitere Studien sinnvoll.

## **MYBL-2**

MYBL-2 gehört zur MYB-Familie der Transkriptionsfaktoren. Ein Einfluss von MYBL-2 auf die Zellproliferation und das Überleben von Zellen durch die Regulation von z.B. Bcl-2 als antiapoptotisches Gen wurde nachgewiesen (Sala 2005).

MYBL-2 lässt in dieser Arbeit einen signifikanten Unterschied im Subgruppenvergleich, mit höheren Expressionswerten in der G3-Subgruppe als in der G1-Subgruppe, erkennen. Dies lässt sich mit der in der Literatur beschriebenen Assoziation von MYBL-2 und einem höheren histologischen Grading in Einklang bringen (Tanner et al. 1995; Ginestier et al. 2006; Hodgson et al. 2003).

Die signifikant höheren Expressionsmittelwerte in den Karzinomgeweben, im Vergleich zu den Normalgewebeproben, bestätigt seine Funktion als Onkogen (Shi et al. 2011). MYBL-2 scheint einer Regulation durch EGFR und E2F zu unterliegen. Eine Co-Expression von EGFR und MYBL-2 wurde bereits von mehreren Autoren beschrieben (Sorlie 2001; Nielsen et al. 2004). Ebenso ist ein Cross-Talk zwischen dem PR und EGF bekannt (Groshong 1997). Nach der Behandlung von Zellen mit Progestinen wurde hier eine erhöhte Sensibilität der Zellen für EGF mit nachfolgenden proliferativen Effekten nachgewiesen. Auch eine Interaktion von STAT5 und PR wurde beobachtet. STAT5 wird des Weiteren durch z.B. EGF aktiviert, sodass ein Cross-Talk des EGF und PR auf Ebene der STAT-5-Signalwege für möglich gehalten wird (Richer 1998). Die Expression von EGFR scheint durch Progestine hochreguliert zu werden (Musgrove et al. 1991; Murphy et al. 1988). Da eine Regulation des MYBL-2 durch EGFR angenommen wird (Hanada et al. 2006), legt dies den Verdacht auf eine positive Korrelation zwischen der Expression von PR und MYBL-2 nahe. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

Die Varianten PR $\Delta$ 5, PRi45a, PR $\Delta$ 4+5, PR $\Delta$ 6+7, PR $\Delta$ 3+4+5 sowie die Isoformen des PR zeigen eine signifikante negative Korrelation mit MYBL-2.

Eine Vermutung wäre, dass diese Varianten den Progesteron-vermittelten Signalweg verändern oder einen Einfluss auf die Wirkung des wildtype-PR ausüben, sodass es zu einem veränderten Cross-Talk mit EGFR kommt. Um einen möglichen Zusammenhang

in diesen komplexen Signalwegen besser darzustellen, sind weitere Studien notwendig, die eine Korrelation des EGFR mit den PR-Spleißvarianten sowie die Ansprechbarkeit der Spleißvarianten auf Progestine untersuchen.

### **Cathepsin L2**

Cathepsin L2 gehört zu den proteolytischen Faktoren und spielt eine Rolle bei der Invasion von Tumorzellen.

Die erhöhte Expression von Cathepsin in einem histologisch höherem Grading (Lah et al. 2000; Skrzypczak et al. 2012) kann durch den vorliegenden nachgewiesenen signifikanten Unterschied der Expression zwischen den G3 und G1-Tumorgeweben bestätigt werden.

In anderen Studien wurde eine negative Korrelation zwischen dem Progesteronrezeptor und Cathepsin L2 beobachtet (Foekens et al. 1998; Thomssen et al. 1995). In der vorliegenden Arbeit zeigt sich mit den Isoformen des Progesteronrezeptors kein signifikanter Zusammenhang, aber ebenfalls ein negativ gerichteten Korrelationskoeffizient. Ein signifikanter negativer Zusammenhang ergibt sich für die Expression von Cathepsin L2 und die PR-Variante  $\Delta 6+7$  ( $r_s = -0,3$ ;  $p = 0,02$ ). Möglicherweise war die gewählte Probenanzahl zu gering, um eine Signifikanz bei den anderen Spleißvarianten nachzuweisen.

Da Cathepsine als zuverlässige Marker für eine schlechte Prognose bekannt sind (Foekens et al. 1998; Kos und Lah 1998), könnte eine niedrige Expression von PR $\Delta 6+7$  womöglich deren Aussagewert als Prognosefaktor ergänzen. Umgekehrt wäre auch ein regulatorischer Einfluss von PR $\Delta 6+7$  auf die Expression der Cathepsine, z.B. über dessen Aktivatoren oder Inhibitoren, denkbar. Diesbezüglich sind weitere Untersuchungen im Hinblick auf eine mögliche Interaktion sinnvoll.



### ***Stromelysin-3***

Stromelysin-3 gehört zur Gruppe der Matrix-Metalloproteasen. Diese sind für die Degradation von extrazellulären Matrixkomponenten zuständig und daher wichtiger Bestandteil der Embryogenese und des Gewebe-Remodelings. Die Degradation dieser Matrixkomponenten spielt daneben eine Rolle bei der Ausbreitung von Tumorzellen in die Umgebung und deren Metastasierung (Woessner 1991; Moscatelli und Rifkin 1988).

Der Marker Stromelysin-3 ergibt innerhalb des Subgruppenvergleichs zwischen Karzinom- und Normalgewebe (Tabelle 26) keinen signifikanten Unterschied in der Expressionsstärke. Allerdings wurden hier lediglich die Werte der positiven Schmelzkurven miteinbezogen.

In der Gruppe der Normalgewebe zeigt sich jedoch ein prozentuales Überwiegen an negativen Schmelzkurven (siehe Tabelle 25), während die Karzinomgewebeproben zu 96,5% Stromelysin-3 exprimieren. Eine vermehrte Expression in Karzinomgewebe, wie es auch in der Literatur beschrieben wird, kann also dennoch bestätigt werden (Köhrmann et al. 2009, Basset et al. 1990). In endometrialem Gewebe wurde eine erhöhte Expression an Stromelysin-3 nachgewiesen, wobei Progesteron als Inhibitor dieses Prozesses fungiert (Itoh et al. 2012). Ebenso zeigen Brustkrebspatientinnen ohne PR eine erhöhte Expression an Stromelysin-3 (Cheng et al. 2010).

In der hier vorliegenden Korrelation zeigt sich einzig ein gleichgerichteter signifikanter Zusammenhang in der Spearman-Rho-Korrelation mit der Variante PR $\Delta$ 2 ( $r_s = 0,35$ ;  $p = 0,04$ ). Da der PR $\Delta$ 2 einen Verlust der DBD und HBD aufweisen dürfte, wird seine Funktion als aktiver PR als fragwürdig erachtet (Richer et al. 1998; Cork et al. 2008). Ein inhibitorischer Einfluss auf die Expression von Stromelysin-3 wäre somit ebenso fragwürdig, womit sich ein gleichgerichteter Korrelationskoeffizient vereinbaren ließe. Umgekehrt wäre ein regulatorischer, aktivierender Einfluss des PR $\Delta$ 2 möglich.

Des Weiteren wäre eine Analyse eines möglichen Zusammenhanges der Expression der PR $\Delta$ 2-Variante mit Metastasierungsstadien interessant, da Stromelysin-3 ein Einfluss auf die Tumorprogression zugesprochen wird (Nöel et al. 1996; Noël et al. 2000). So zeigten sich bereits signifikante Assoziationen zwischen der Expression von

Stromelysin-3 und der Aggressivität sowie Metastasierung von Tumoren (Cheng et al. 2010). Hierbei scheint Stromelysin-3 unter anderem die Zellen vor programmiertem Zelltod zu schützen (Takeuchi et al. 2011). Außerdem scheint die Expression von Stromelysin-3 abhängig vom Reproduktionszyklus zu sein (Rodgers et al. 1994). Weitere Studien mit Einbezug des Zyklusstandes würden einen Zusammenhang vermutlich genauer darstellen können.

### ***Ki-67***

Ki-67 wird in der Therapie des Mammakarzinoms als Proliferationsmarker genutzt und ermöglicht die Zuordnung zu den verschiedenen molekularen Subtypen des Mammakarzinoms (Tabelle 1) mit hohem Index innerhalb des Luminal-B-Subtyps (Goldhirsch et al. 2011). Höhergradige DCIS-Tumore sind mit einer erhöhten Ki-67 Expression assoziiert (Ringberg et al. 2001), während invasive lobuläre Karzinome eine niedrige Ki-67-Expression zeigen (Mathieu et al. 2004). In einigen Studien wurde eine positive Korrelation zwischen Ki-67 und dem Tumor-Grading nachgewiesen (Sahin et al. 1991; Potemski et al. 2006; Rosa et al. 2008). Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit bestätigt diesen Zusammenhang.

In der G3-Gruppe zeigt sich eine signifikant erhöhte Ki-67 Expression gegenüber der G1-Subgruppe (Tabelle 28). Lediglich der Vergleich der G3 ER $\alpha$  positiven und G3 ER $\alpha$  negativen Subgruppe ergibt kein signifikantes Ergebnis. Dies könnte durch eine ER $\alpha$ -Unabhängigkeit des Ki-67 bedingt sein. Jedoch muss bedacht werden, dass im ER $\alpha$  negativen Gewebe in dieser Arbeit häufig ER $\alpha$ -Positivität in der real time-PCR besteht. Die Analyse eines Zusammenhanges von Ki-67 mit den PR-Spleißvarianten ergibt kein statistisch signifikantes Ergebnis. In der Literatur gibt es bezüglich der Korrelation zwischen Ki-67 und dem Progesteronrezeptor kontroverse Resultate (Rosa et al. 2008; Honma et al. 2013; Anderson et al. 2011).

### **Cyclin-B1**

CyclinB1 hat als Komplex mit CDK1 eine Kontrollfunktion innerhalb des Zellzyklus und ist für die Initiation der Mitose notwendig (Pines und Hunter 1990). Eine Überexpression an Cyclin-B1 wurde bereits in verschiedenen Karzinomen beschrieben (Murakami et al. 1999; Soria et al. 2000; Ikuerowo et al. 2006), so auch in Mammakarzinomgewebe (Chae et al. 2011). Während eine Studie mit geringer Probenanzahl keine Assoziation zwischen Cyclin-B1 und Grading, Tumorgroße, Nodalstatus sowie ER-Status fand (Winters et al. 2001), zeigten andere Studien mit größerem Probenumfang eine Assoziation einer hohen Cyclin B1 Expression mit hohem Grading, hohem Ki-67-Level und ER/PR-Negativität (Kühling et al. 2003, 2003; Aaltonen et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit findet sich ein signifikanter Unterschied der CyclinB1-Expression zwischen den G1- und G3-Geweben, sodass eine Assoziation zwischen erhöhter CyclinB1-Expression und höherem Grading ebenfalls plausibel erscheint.

Es besteht keine signifikante Korrelation zwischen der Expression von CyclinB1 und panPR, bzw. den PR-Isoformen, wobei diese schwache negative Korrelationskoeffizienten aufweisen. Ein positiv gerichteter Zusammenhang ergibt sich mit der PR-Variante  $\Delta 7$  ( $r_s = 0,36$ ;  $p = 0,01$ ). Für PR $\Delta 7$  ist ein Verlust der LBD bei Erhalt der DBD, NLS, AF-1 und AF-1 Domänen wahrscheinlich, womit der Rezeptor womöglich einen hormonunabhängigen Einfluss auf die Progesteronrezeptoraktivität besitzt. Eine Interaktion durch Heterodimer-Bildung mit dem wild-type-PR wäre denkbar (Springwald et al. 2010).

Aaltonen et al. propagiert einen prognostischen Wert des CyclinB1 in Bezug auf ein schlechteres OS (overall survival) und MFS (metastase free survival), der teils höher als der prädiktive Wert des PR oder HER2neu ausfällt. Immunhistochemische Analysen weisen eine Korrelation zwischen längerem OS und PR-Status nach (Elledge et al. 2000). Ebenso könnte dem PR $\Delta 7$  eine gesonderte prognostische Stellung zukommen.

### ***Her2neu***

Her2neu ist ein 185kDa Rezeptorprotein, welches durch das Gen 17q21.1 kodiert wird. Es besitzt eine intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität und zeigt eine 50%ige Homologie mit dem EGFR (Coussens et al. 1985; Akiyama et al. 1986). Durch den Ras-MAPK-Signalweg wird über den Her2neu-Rezeptor die Zellproliferation stimuliert und über den mTOR-Signalweg die Apoptose der Zellen gehemmt (Yarden und Sliwkowski 2001). Eine Überexpression des Her2neu-Gens wird durch immunhistochemische Färbungen und in Zweifelsfällen durch FISH (Floureszenz-in-situ-Hybridisierung) ermittelt und findet sich in etwa 20-30% der Mammakarzinome.

Eine Überexpression ist mit einer schlechten Prognose, einem aggressiven Tumortyp sowie einem kürzeren Überleben assoziiert (Slamon et al. 1987; Slamon et al. 1989). Über den Her2neu-Rezeptor besteht eine Therapiemöglichkeit mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Penault-Llorca et al. 2009). Für Trastuzumab wird sowohl als Monosubstanz als auch in Kombination mit Chemotherapeutika ein therapeutischer Nutzen beschrieben (Vogel 2002; Slamon et al. 2001). Dieser Benefit scheint eine positive Korrelation mit der Her2neu-Genamplifikation zu zeigen (Arnould et al. 2007). Andererseits ist eine Her2neu-Amplifikation mit einem schlechteren Ansprechen auf eine endokrine Therapie assoziiert (Wright et al. 1992), was jedoch in anderen Studien nicht bestätigt wurde (Yamashita et al. 2006).

In dieser Arbeit weisen alle Karzinomgewebe eine Expression an Her2neu auf (siehe Tabelle 31). In der hier vorliegenden statistischen Analyse kann jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Expressionswerten der Karzinom- und der Normalgeweben festgestellt werden (Tabelle 32). Nur 20-30% der Brustkrebspatientinnen zeigen eine Überexpression von Her2neu auf Proteinebene (Slamon et al. 1989). Eine Definition der Überexpression auf Genebene scheint derzeit nicht zu existieren.

Eine positive Spearman-Korrelation zeigt sich zwischen Her2neu und den Varianten PR $\Delta$ 2, PR $\Delta$ 5, PRi45a, PRi45b, PR $\Delta$ 2+3, PR $\Delta$ 4+5 und PR $\Delta$ 6+7, sowie der Isoform PRB und dem panPR. In der Literatur wurden bereits Interaktionen zwischen den Progestin- und HRG/erbB-2 Signalwegen beschrieben. Hergulin (HRG) fungiert als Ligand der erB-Rezeptorfamilie. In bestehenden Forschungsergebnissen wurde gezeigt, dass die

transkriptionelle Aktivität von Steroidhormonrezeptoren, so auch die des Progesteronrezeptors, durch erbB-Signalwege ligandenunabhängig induziert werden können (Labriola et al. 2003; Zhang et al. 1994). Des Weiteren wurde eine mögliche Aktivierung der ErbBs durch PR diskutiert (Balañá et al. 1999; Daniel et al. 2007).

Eine weitere Interaktion innerhalb des PR/erbB-Cross-Talks wurde über Stat3 (signal transducer and activator of transcription) beschrieben, welcher bedeutend für das Tumorwachstum ist (Proietti et al. 2005; Proietti et al. 2009; Beguelin et al. 2010). Es wäre daher denkbar, dass den PR-Spleißvarianten ebenfalls eine Rolle innerhalb dieser Signalwege zu Gute kommt. Ebenso könnten diese Signalwege eine weitere Therapieoption darstellen (Proietti et al. 2009), die in einer Blockade von PR zur Hemmung der PR/erbB2/Stat-Interaktion besteht und damit die Progression des PR-positiven/erbB-positiven Tumors einschränken könnte. Ein besseres Verständnis über die Rolle der Spleißvarianten des Progesteronrezeptors, welche in dieser Arbeit signifikant mit der Expression von Her2neu korrelieren, könnte eine solche Therapie optimieren. Weiterhin könnten diese Varianten das Ansprechen auf eine Therapie mit Trastuzumab beeinflussen.

**p21/WAF**

P21/WAF ist ein unspezifischer Inhibitor von CDKs (cyclin-dependent-kinases) (Xiong et al. 1993) und hemmt die Progression im Zellzyklus (Waldman et al. 1995). Das Tumorsuppressorgen p53 spielt als Transkriptionsfaktor für WAF eine Rolle. Durch die Bindung von p53 an die Promotorregion wird die Transkription von WAF hochreguliert (el-Deiry et al. 1993). Die Funktionen von p21/WAF sind komplex. So wurde sowohl eine Funktion als Tumorsuppressor als auch als Onkogen beschrieben (Abbas und Dutta 2009).

Neuere Studien konnten eine Interaktion zwischen ER $\alpha$  und p53 nachweisen: ER $\alpha$  bindet an p53 und hemmt die Transkriptionsaktivität von p53. Dazu zählen der durch p53 hervorgerufene Zellzyklusarrest sowie die durch p53 verlinkte Apoptose (Liu et al. 2009; Sayeed et al. 2007; Liu et al. 2006).

Die Subgruppenvergleiche G1 ER $\alpha$  positiv/G3 ER $\alpha$  negativ und G3 ER $\alpha$  positiv/G3 ER $\alpha$  negativ sind in der vorliegenden Untersuchung durch signifikante Unterschiede gekennzeichnet mit höheren Expressionswerten in den ER $\alpha$  positiven Proben. Dies wäre vereinbar mit einer Interaktion zwischen p21/WAF und ER $\alpha$ , z.B. über p53. Da Mutationen im p53-Gen und andere Abweichungen innerhalb des Signalweges ebenfalls einen Einfluss auf die Karzinogenese des Brustkrebses haben (Lacroix 2006), wäre in zukünftigen Untersuchungen zusätzlich die Expression von p53 und deren Wechselwirkung mit der Expression von p21/WAF interessant.

Im Vergleich der Karzinom-/Normalgewebe resultiert kein signifikanter Unterschied, jedoch zeigt sich innerhalb der Karzinomgruppe ein deutlich größerer Anteil an Expressionen von p21/WAF gegenüber der Normalgewebegruppe.

Kein signifikanter Zusammenhang liegt innerhalb der Analyse der p21/WAF-Expression mit den verschiedenen Progesteronrezeptor-Spleißvarianten vor.

**GRB-7**

GRB7 ist ein Signalmolekül, welches eine Bindung mit einer großen Zahl von Rezeptor-Tyrosinkinasen eingehen und von diesen aktiviert werden kann, so z.B. auch durch EGFR und Her2 (Margolis et al. 1992). Es wird eine Co-Amplifikation und feste Bindung mit Her2 und eine Überexpression in Brustkrebszellen beschrieben (Stein et al. 1994). GRB-7 wird eine Rolle im Rahmen der Zellmigration sowie Tumorprogression zugesprochen (Han et al. 2001, 2000).

Des Weiteren ist eine Interaktion mit Calmodulin, einem calciumbindenden regulatorischen Protein, beschrieben, welches an der hohen Motilität von Karzinomzellen beteiligt zu sein scheint (Li et al. 2005). Es wurden Spleißvarianten für GRB-7 entdeckt (Daly 1998) und die Möglichkeit einer Interaktion mit sich selbst oder anderen Mitgliedern der GRB-7 Familie über Homo-/Hetero-/Dimer-/Oligomer-Bildungen beschrieben (Dong et al. 1998). Die Signalwege und Interaktionen scheinen sehr umfangreich zu sein.

In der vorliegenden Arbeit findet sich eine signifikante positive Korrelation der Expression von GRB-7 mit PR $\Delta$ 5. Diese PR-Variante korreliert ebenso hoch signifikante mit Her2neu, sodass ein Zusammenhang des PR $\Delta$ 5 und der gemeinsamen Signalkaskade von Her2neu und GRB-7 (Alpy et al. 2003) denkbar wäre. In diesem Zusammenhang könnte eine Bedeutung der Spleißvariante PR $\Delta$ 5 innerhalb der Tumorprogression und damit eine Assoziation mit einer schlechteren Prognose vorliegen.

**CD 68**

CD68 ist ein Oberflächenmolekül, das als „cluster of differentiation“ den Makrophagen zugeordnet ist. Neben genetischen und epigenetischen Veränderungen von Genen, die für die normale epitheliale Zellproliferation, Zelldifferenzierung und -polarität des Brustgewebes wichtig sind, wird auch ein Einfluss von Interaktionen zwischen Tumor- und umgebenden Stromazellen auf den Prozess der Tumorprogression und der Metastasierungsfähigkeit dargelegt (DeNardo und Coussens 2007). Tumorassoziierte Makrophagen können bis zu 50% der Tumormasse ausmachen (Mahmoud et al. 2012).

Des Weiteren wird eine Assoziation zwischen der Makrophagendichte und dem Tumorgrading beschrieben, wohingegen der Makrophagenzahl kein prognostischer Wert zugesprochen wird (Mahmoud et al. 2012; Eiró et al. 2012).

Innerhalb der vorliegenden Auswertung ergeben sich keine signifikanten Unterschiede der Expression von CD 68 innerhalb der Subgruppenvergleiche (Tabelle 38). Es zeigt sich eine negative Korrelation mit PR $\Delta$ 3 ( $r_s = -0,46$ ;  $p = 0,00$ ) sowie eine positive Korrelation mit PR $\Delta$ 2+3 ( $r_s = 0,37$ ;  $p = 0,01$ ). Bereits beschrieben wurde eine Assoziation zwischen CD68 und negativem PR-Status (Mahmoud et al. 2012), jedoch im Rahmen immunhistochemischer Nachweise. Das Exon 3 codiert für den zweiten Zinkfinger der DBD (Misrahi et al. 1993). Gleichermäßen codiert Exon 2 für den ersten Zinkfinger der DBD und könnte mittels Leserahmenverschiebung zu einem Protein ohne LBD führen (Richer et al. 1998). Die beiden Varianten könnten also durch Interaktionen einen Einfluss auf die wildtype-PR-Expression haben und zu einem immunhistochemisch negativen PR-Status führen oder auch direkt die CD-68 Expression beeinflussen.

Die Ligandenbindung könnte dabei als Unterscheidungsmerkmal der beiden Varianten eine besondere Rolle spielen und die unterschiedlich gerichteten Korrelationskoeffizienten erklären. Ein Vergleich der Expressionen sowohl auf molekularer als auch zellulärer Ebene könnte einen derartigen Einfluss besser definieren. Da Makrophagen sehr komplexe Funktionen ausüben, wäre auch eine genauere Untersuchung eines Zusammenhanges im Hinblick auf verschiedene Subgruppen von Makrophagen sinnvoll. Mehrere Studien haben sich bereits mit



Makrophagen als therapeutisches Target im Rahmen der Tumorthherapie beschäftigt (Robinson et al. 2003; Vukanovic und Isaacs 1995).

### **BAG-1**

BAG-1 kodiert für eine Familie von Cochaperon-Proteinen und interagiert mit einer großen Anzahl von Hitzeschockproteinen und nukleären Hormonrezeptoren (Townsend et al. 2005). Die Überexpression von BAG-1 geht mit einer Suppression von Caspase-Aktivitäten und Apoptose einher. Die Caspaseaktivität wird therapeutisch genutzt, indem sie durch verschiedene Chemotherapeutika oder eine Radiatio induziert wird (Takayama und Reed 2001; Höhfeld 1998).

Die BAG-1- Expression lässt in dieser Arbeit signifikante Unterschiede im Subgruppenvergleich bezüglich der ER $\alpha$  positiven und negativen Subgruppen erkennen, mit höherer Expression innerhalb der ER $\alpha$  positiven Proben (Tabelle 40). Eine Co-Expression von BAG-1 mit ER und PR wurde bereits beschrieben (Nadler et al. 2008). BAG-1 erhöht die ER-abhängige Transkription (Cutress et al. 2003), damit also auch die ER-abhängige Transkription des PR. Die statistische Analyse lässt signifikante Zusammenhänge mit 75% der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Spleißvarianten erkennen (Tabelle 40), was die genannte ER/PR-Assoziation bestätigt. Dennoch wäre es aufschlussreich, inwieweit sich die nicht-korrelierenden Spleißvarianten PR $\Delta$ 2, PR $\Delta$ 3 und PR $\Delta$ 3+4+5+6 dieser Assoziation entziehen. Von Interesse ist, dass Bcl-2 ebenfalls in 75% der Fälle eine Korrelation aufweist (Tabelle 18), PR $\Delta$ 2 und PR $\Delta$ 3+4+5+6 ausgeschlossen. In diesem Zusammenhang ist die beschriebene Assoziation von BAG-1 mit Bcl-2 in der Suppression der Apoptose zu beachten (Roth et al. 2000; Takayama et al. 1995), welche ebenfalls innerhalb der Mammakarzinome eine Rolle spielen könnte. Möglicherweise besitzt die Expression von BAG-1 (Cutress et al. 2003) in Kombination mit den Progesteronrezeptor-Spleißvarianten einen höheren Wert als Prädiktor für das Ansprechen auf eine Hormontherapie.

**SCUBE-2**

SCUBE-2 stellt ein membranassoziiertes Protein mit mehreren Domänen dar (Lin et al. 2011), das zuerst in Gefäßendothelien entdeckt wurde (Yang et al. 2002). Eine Expression wurde zudem innerhalb von invasivem Brustkrebsgewebe detektiert (Paik et al. 2004; van 't Veer et al. 2002; Cheng et al. 2009) und geht mit einem besseren klinischen Outcome einher (Cheng et al. 2009).

Innerhalb der Subgruppenvergleiche ergibt sich für SCUBE-2 in der vorliegenden Arbeit ein möglicher Zusammenhang mit dem ER $\alpha$ -Status, da ein signifikanter Unterschied zwischen den ER $\alpha$  positiven und negativen Subgruppen zu sehen ist, mit höherem Expressionswert innerhalb der ER $\alpha$  positiven Gruppe (Tabelle 42). Des Weiteren besitzt die ER $\alpha$  negative Subgruppe einen deutlich größeren Anteil an negativen Proben (Tabelle 45).

Innerhalb der Korrelationstestung lässt sich für alle Spleißvarianten des PR bis auf PR $\Delta$ 2 und PR $\Delta$ 2+3 ein gleichgerichteter signifikanter Zusammenhang erfassen. In der Literatur wurde für SCUBE-2 bisher nur eine negative Assoziation mit der PR-Expression geschildert, allerdings nach immunhistochemischer Bestimmung (Cheng et al. 2009). Dies könnte durch eine Interaktion auf Proteinebene, ein Überwiegen der immunhistochemisch nicht erfassten Spleißvarianten oder eine Verbindung dieser mit dem PR bedingt sein.

Bei höheren PR-Level ist ein besseres Outcome der Patientinnen beschrieben (Elledge et al. 2000), vor allem in Kombination mit einem ER-positiven Status (Linke et al. 2006). Der PR- und SCUBE-2 Status könnten einen gemeinsamen prädiktiven Wert besitzen. Möglicherweise spielt Exon 2, welches für die DBD kodiert (Horwitz 1992), für diese Korrelation eine wichtige Rolle. Weitere Untersuchungen sind nötig, um eine solche Interaktion zu detektieren.

### ***E-Cadherin***

E-Cadherin gehört zu den Calcium-abhängigen Glykoproteinen, die für Zell-Zell-Kontakte wichtig sind und in den meisten normalen Epithelgeweben exprimiert werden (Takeichi 1991; Berx et al. 1995). Der Verlust von E-Cadherin führt zur Dedifferenzierung ist mit der Invasivität von Tumoren assoziiert (Frixen et al. 1991). Auch in invasiven lobulären Brustkrebsgeweben kann ein Verlust von E-Cadherin nachgewiesen werden (Wahed et al. 2002; Acs et al. 2001).

Während in der Literatur eine Assoziation mit dem histologischen Grading der Tumoren beschrieben wird (Gamallo et al. 1993), ergibt sich in dieser Arbeit kein statistischer Unterschied zwischen der G1- und G3-Subgruppe (Tabelle 44). Dies könnte durch eine zu kleinen Probenanzahl bedingt sein, wie es auch in einer anderen Studie der Fall war (Nurismah et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der ER $\alpha$  positiven und negativen Subgruppen erkennen. Dies lässt sich mit der Feststellung vereinen, dass der Verlust an E-Cadherin mit ER-Negativität assoziiert ist (da Silva et al. 2010). Eine frühere Studie bewertet den Einfluss von Tamoxifen auf die durch E-Cadherin hergestellte Zelladhäsion als positiv (Bracke et al. 1994), während eine neuere Studie einen negativen Effekt auf die Invasion von Brustkrebszellen durch Tamoxifen bei schlechten Zell-Zell-Kontakten nachweist (Borley et al. 2008). Dies könnte bedeuten, dass der Nutzen einer Tamoxifentherapie an die E-Cadherin-abhängigen Zellkontakten gebunden ist.

In der vorliegenden Auswertung finden sich positive Korrelationen der E-Cadherin-Expression mit PR $\Delta$ 5, PRi45a, PR $\Delta$ 2+3, PR $\Delta$ 4+5, PR $\Delta$ 6+7, den Isoformen sowie panPR. Es wäre also ein Zusammenhang zwischen der Expression von E-Cadherin und verschiedenen PR-Spleißvarianten denkbar, da beide mit dem ER-Status assoziiert sind (Horwitz und McGuire 1975; Fujita et al. 2003). Dies könnte einen zusätzlichen prädiktiven und prognostischen Nutzen bedeuten.

## **PTEN**

Der Verlust der Heterozygotie (LOH) im Chromosom 10q23 ist bei vielen Arten von Karzinomen zu beobachten. PTEN wird von diesem Genlocus kodiert und besitzt eine Rolle als Tumorsuppressorgen (Li et al. 1997). Eine LOH des PTEN wurde bisher in etwa 30-40% von Brustkrebsgeweben beschrieben (Garcia et al. 1999; Feilotter et al. 1999).

Die Subgruppenvergleiche dieser Arbeit verzeichnen einen signifikanten Unterschied zwischen den Expressionswerten innerhalb der Normalgewebe und Karzinomgewebe mit höherem Mittelwert in den Normalgeweben. Dies bestätigt die bereits beobachtete erniedrigte immunhistochemische PTEN-Expression innerhalb von Brustkrebsgewebe innerhalb anderer Studien (Bose et al. 2002; Tsutsui et al. 2005).

Während PTEN als Inhibitor des PI3K/Akt-Signalweges fungiert, führt eine Mutation im PTEN-Gen zur Aktivierung des Akt-Signalweges (Stambolic et al. 1998). Die Aktivierung von Akt ist wiederum mit einem schlechteren Outcome im Rahmen einer endokrinen Therapie assoziiert (Pérez-Tenorio und Stål 2002; Kirkegaard et al. 2005). Patientinnen mit negativem Akt-Status profitieren hingegen von einer endokrinen Therapie (Stål et al. 2003). Weiterhin wird eine Assoziation der Aktivierung von Akt mit einer erhöhten Aktivität des ER, jedoch reduziertem Level und Aktivität des PR, geschildert (Cui et al. 2003). Dies lässt vermuten, dass erniedrigte Expressionen an PTEN mit einer Aktivierung des Akt-Signalweges einhergehen und damit zur reduzierten Aktivität und Expression des PRs führen.

Ähnlich der Korrelationsergebnisse von SCUBE-2 zeigt sich eine positive, gleichgerichtete, signifikante Korrelation von PTEN mit allen Spleißvarianten bis auf PR $\Delta$ 2 und PR $\Delta$ 2+3. Somit könnten die Expressionslevel der PR-Spleißvarianten die Expressionslevel des PTEN widerspiegeln und die Beurteilung des Outcomes verbessern.

**GSTM-1**

GSTM-1 gehört zur Familie der Glutathion-S-Transferasen, welche wichtige Enzyme in der Detoxifikation von organischen Stoffen darstellen (Mishra et al. 2011). Einige Studien belegen die Bedeutung der Glutathion-S-Transferasen in der Resistenz gegenüber einer Chemotherapie (Schisselbauer et al. 1990; Tew 1994; Morrow et al. 1998).

In der vorliegenden Arbeit kann eine Korrelation gleicher Richtung zwischen GSTM-1 und den PR-Varianten PR $\Delta$ 2, PR $\Delta$ 5, PRi45a, PR $\Delta$ 3+4, PR $\Delta$ 6+7 und PR $\Delta$ 3+4+5, sowie den PR-Isoformen erfasst werden. Trotz intensiver Recherche konnte in der einschlägigen Literatur bisher keine Assoziation zwischen GSTM-1 und dem Progesteronrezeptor gefunden werden.

### 6.7 „Matched Pairs“

Innerhalb der Varianten PR $\Delta$ 7, PR $\Delta$ 6+7 und den PR-Isoformen kann eine signifikante Disparität der zentralen Tendenz zwischen den Karzinom- und Normalgewebeproben festgestellt werden, mit höheren Werten in der Karzinomgruppe. Auffällig ist hier die Exon 7-Deletion, die diesen beiden PR- Spleißvarianten gemein ist. Daher stellt sich die Frage, ob die Exon 7-Deletion eine Rolle in der Karzinogenese spielt. Beide Spleißvarianten zeigen verfrühte Stopp-Codons in Exon 8 und kodieren für Proteine, denen eine funktionelle LBD fehlt, während die anderen Domänen vorhanden sind.

Diese Rezeptoren könnten also kein Östrogen binden, aber dennoch in einer hormonunabhängigen Weise interagieren, da die Fähigkeit zur DNA-Bindung und Dimerisierung weiterhin bestünde (Springwald et al. 2010). Für die PR-Variante  $\Delta$ 6, welche in dieser Arbeit aufgrund negativer Proben nicht weiter untersucht wird, ist bereits eine solche Interaktion bekannt. PR $\Delta$ 6 scheint ebenfalls keine funktionelle LBD zu besitzen. Dieser Variante wird eine inhibitorische Wirkung auf die Bindung des wildtype PRs an PREs zugesprochen (Richer et al. 1998).

Da alle anderen in dieser Arbeit untersuchten PR-Spleißvarianten eine funktionelle LBD besitzen, wäre eine karzinomgebundene Interaktion durchaus denkbar. Eine Interaktion der PR $\Delta$ 7 und PR $\Delta$ 6+7 Varianten mit dem wildtype PR, beispielsweise innerhalb der PREs, müsste jedoch in weiteren Studien auf Proteinebene untersucht werden. Würden diese Varianten eine Blockade der Bindung des wildtype-PR an PREs verursachen, wäre ein Nichtansprechen auf eine endokrine Therapie trotz PR-positiver Klassifikation möglich (Richer et al. 1998), wie es bei ungefähr 30% der PR-positiven Tumoren der Fall ist (McGuire et al. 1986).

Auch für die PR-Isoformen lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Karzinom- und den Normalgewebeproben nachweisen. Bereits das erhöhte Risiko durch eine kombinierte Hormonersatztherapie im Vergleich zu einer alleinigen Östrogen-Therapie bringt die bedeutende Rolle der Progesteron-Signalwege in der Entwicklung von Brustkrebs zum Ausdruck (Cork et al. 2008; Persson et al. 1999; Stahlberg et al. 2004).

Innerhalb von Studien konnte ein Überwiegen des PR-A innerhalb der PR-A/PR-B Ratio in Karzinomgeweben nachgewiesen werden (Graham et al. 1995; Graham et al. 2005). Aufgrund der erhöhten Expression der PR-Isoformen innerhalb der Karzinomgewebe in der vorliegenden Arbeit kann eine Bedeutung der Signalwege über diese Rezeptoren innerhalb der Karzinogenese vermutet werden.

## 7. Zusammenfassung und Ausblick

Der Progesteronrezeptor spielt eine wesentliche Rolle innerhalb der prädiktiven und prognostischen Erwägungen bei der Therapie des Mammakarzinoms (Ravdin et al. 1992; Hammond et al. 2010; Bardou 2003). Wie geschätzte 60% der menschlichen Gene (Lander et al. 2001), wird auch das PR-Gen durch alternatives Spleißen in verschiedene mRNAs umgeschrieben, aus denen unterschiedliche Rezeptorproteine hervorgehen, die durch veränderte Aminosäuresequenzen einen Verlust oder Zugewinn an Funktionen aufweisen (Cork et al. 2008).

Der Hormonrezeptor-Status wird derzeit durch immunhistochemische Nachweise mittels N-Terminal-gerichteter Antikörper ermittelt (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF et al. 2012; Hanley et al. 2009), welche jedoch weder alle Spleißvarianten des Progesteronrezeptors erfassen noch zwischen diesen unterscheiden können (Richer et al. 1998). So werden vermutlich Patientinnen als PR negativ klassifiziert, die solche Rezeptorvarianten exprimieren und daher auf eine endokrine Therapie ansprechen könnten.

Innerhalb dieser Arbeit konnte die Expression von vielen PR-Spleißvarianten (Abbildung 6-8) in den untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Es zeigt sich ein Überwiegen innerhalb der ER $\alpha$  positiven Subgruppen, wahrscheinlich durch die ER-abhängige Transkription des PR bedingt (Horwitz und McGuire 1975). Unterstützend zu dieser Annahme ergibt sich eine gleichgerichtete Korrelation aller Varianten mit der Expression von panER. Weitergehend besitzen alle Spleißvarianten eine gleichgerichtete Korrelation mit dem panPR, sodass eine prognostische und prädiktive Aussagekraft ebenfalls für die Spleißvarianten angenommen werden kann.

Mehr als dreiviertel der immunhistochemisch als ER $\alpha$  negativ klassifizierten Karzinomgewebe zeigen in dieser Arbeit eine Expression an panER $\alpha$  mittels real time-PCR. Da bereits Spleißvarianten des ER $\alpha$  bekannt sind (Poola und Speirs 2001; McGuire et al. 1991), wäre eine Gegenüberstellung der Expression dieser Varianten und eine Untersuchung auf Zusammenhänge mit den Progesteronrezeptor-Spleißvarianten empfehlenswert.



Die Ergebnisse dieser Arbeit präsentieren des Weiteren zahlreiche Korrelationsergebnisse zwischen der Expression von PR-Spleißvarianten und verschiedenen biologischen Markern (Tabelle 49 und 50). Untersuchungen auf Proteinebene und eine Gegenüberstellung der Ergebnisse könnten zu einem besseren Verständnis beitragen.

Weiterhin wären Studien mit größeren Probenumfängen sinnvoll, um die hier gefunden Korrelationen zu bestärken.

Diese Arbeit unterstützt somit die Annahme, dass mit steigendem Verständnis über die Interaktionen und das Auftreten von Progesteronrezeptor-Spleißvarianten, die prädiktive und prognostische Aussagekraft des Hormonrezeptorstatus verbessert, eine Über- oder Untertherapie von Patientinnen in Zukunft vermieden und die individualisierte Therapie weiter optimiert werden könnte.

## 8. Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1 Schematische Darstellung eines nuklearen Rezeptors mit seinen verschiedenen Domänen. (Aranda und Pascual 2001).                                    | 11 |
| Abbildung 2 Schematische Darstellung des PR-Gens mit seinen Isoformen PR-A, PR-B und PR-C (Cork et al. 2008).  | 12 |
| Abbildung 3 a) Darstellung der präkursorischen mRNA 3b) Die verschiedenen Modelle des Alternativen Spleißens. (Cork et al. 2008)                               | 14 |
| Abbildung 4 Erstellen der Verdünnungsreihe zur Herstellung spezifischer Kalibratoren.  | 23 |
| Abbildung 5 Beispiel einer Gelelektrophorese   | 25 |
| Abbildung 6 Expressionsprofil G1, ER $\alpha$ positiv  | 37 |
| Abbildung 7: Expressionsprofil G3, ER $\alpha$ negativ   | 38 |
| Abbildung 8 Expressionsprofil G3, ER $\alpha$ positiv  | 38 |
| Abbildung 9 Expressionsprofil Normalgewebe   | 39 |
| Abbildung 10 Darstellung aller Expressionsprofile in der Gesamtübersicht   | 40 |
| Abbildung 11 prozentualer Anteil an positiven Proben, d.h. sicherer Expression, der einzelnen PR-Varianten unter Einbezug aller ER $\alpha$ -positiven Proben. | 42 |
| Abbildung 12 prozentualer Anteil an positiven Proben, d.h. sicherer Expression, der einzelnen PR-Varianten unter Einbezug aller ER $\alpha$ -negativen Proben. | 43 |
| Abbildung 13 Wilcoxon-Test der untersuchten "matched pairs" für die Spleißvariante PR $\Delta$ 7   | 74 |
| Abbildung 14 Wilcoxon-Test der untersuchten "matched pairs" für die Spleißvariante PR $\Delta$ 6+7   | 74 |
| Abbildung 15 Wilcoxon-Test der untersuchten "matched pairs" für die Isoform PR B.75  |    |
| Abbildung 16 Wilcoxon-Test der untersuchten "matched pairs" für PR AB  | 75 |

## 10. Abkürzungsverzeichnis

|                |   |
|----------------|---|
| Dscam          | down syndrome cell adhesion molecule  |
| HDAC1          | histone deacetylase 1   |
| NCoR           | nuclear receptor corepressors   |
| AF             | activation factor   |
| AG-Dinukleotid | Adenin/Guanin-Dinukleotid   |
| AWMF           | Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften |
| BAG-1          | BCL2-associated athanogene  |
| Bcl-2          | B-cell lymphoma 2   |
| BRCA           | Breast Cancer   |
| BUS            | B-upstream-Segment  |
| cDNA           | complementary desoxyribonucleic acid  |
| Ct-Wert        | cycle treshold Wert   |
| DBD            | DNA binding domane  |
| DCIS           | Ductal Carcinoma in Situ  |
| AU Dinukleotid | Adenin/Uracil-Dinukleotid   |
| AC Dinukleotid | Adenin/Cytosin-Dinukleotid  |
| EGFR           | Epidermal growth factor receptor  |
| ER             | Östrogenrezeptor  |
| erbB           | siehe Her2  |
| FISH           | Floureszenz in situ Hybridisierung  |
| GnRH           | Gonadotropin releasing hormone  |
| GU-Dinukleotid | Guanosin/Uracil-Dinukleotid   |

|          |  |
|----------|--|
| HBD      | Hormon-Bindungs-Domäne   |
| Her2     | human epidermal growth factor receptor 2/erbB 2  |
| HRG      | Hergulin   |
| hnRNPs   | heterogeneous nuclear ribonucleoproteins   |
| ID       | inhibitorische Domäne  |
| LBD      | ligand binding domane  |
| LOH      | Loss of heterozygosity   |
| MFS      | metastase free survival  |
| MIB-1    | Mind bomb-1  |
| mTOR     | mammalian target of rapamycin  |
| Mybl-2   | v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2                                 |
| NLS      | nuclear location signal  |
| NTD      | N-terminale-Domäne   |
| OS       | overall survival   |
| PAI-1    | Plasminogenaktivatorinhibitor-1  |
| PCR      | polymerase chain reaction  |
| PR       | Progesteronrezeptor  |
| Prä-mRNA | präkursorische mRNA  |
| PRE      | progesterone responsive elements   |
| PTEN     | Phosphatase and tensin homologe  |
| Ras      | Rat sarcoma  |
| MAPK     | mitogen-activated protein kinase   |
| SCUBE-2  | Signal peptide-complement proteins C1r/C1s, Uegf, and Bmp1-EGF domain-containing protein 2 |

|            |  |
|------------|--|
| SF         | Spleißfaktoren   |
| Stat3      | signal transducer and activator of transcription                   |
| STAT       | signal transducers and activators of transcribition                |
| STK-15     | serine/threonine kinase-15   |
| TBE-Puffer | Tris/Borsäure/EDTA   |
| uPA        | urokinase-type plasminogen activator                               |
| p21/WAF    | cyclin-dependent kinase inhibitor 1 oder CDK-interacting protein 1 |

## 9. Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1 Einteilung der intrinsischen Subtypen nach Goldhirsch et al. 2011 .....  | 10 |
| Tabelle 2 Verwendete Materialien .....   | 19 |
| Tabelle 3 Auswahl der spezifischen Kalibratoren und deren Ct-Wert .....  | 24 |
| Tabelle 4 Einstellung des LightCycler-Programms .....  | 28 |
| Tabelle 5 Übersicht der verwendeten Primer für die PR-Varianten.....   | 30 |
| Tabelle 6 Untersuchte Varianten mit zugehöriger Fragmentgröße und spezifischer Schmelztemperatur. ....   | 32 |
| Tabelle 7 Primerbezeichnung und zugehörige Primersequenz der einzelnen Marker.   | 33 |
| Tabelle 8: Übersicht der untersuchten PR-Spleißvarianten .....   | 36 |
| Tabelle 9 Anteil an positiven Expressionen innerhalb der Subgruppen. ....  | 41 |
| Tabelle 10: p-Werte des T-Tests für unabhängige Stichproben.. ....   | 44 |
| Tabelle 11 Mittelwerte der R-Werte innerhalb der Subgruppen. ....  | 44 |
| Tabelle 12 Spearman rho Korrelation panPR / Varianten .....  | 46 |
| Tabelle 13 Bewertung des Korrelationskoeffizienten (Bühl und Zöfel 2000).....  | 46 |
| Tabelle 14 Spearman rho Korrelation panERα/ PR-Spleißvarianten . ....  | 47 |
| Tabelle 15 p-Werte des T-Tests für unabhängige Stichproben. Signifikante Ergebnisse gelb markiert. Es wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0.05$ angenommen..... | 48 |
| Tabelle 16 Mittelwerte der Expression (R-Werte) der verschiedenen Marker innerhalb der Subgruppen.....   | 49 |
| Tabelle 17 Anteil (in%) an Expressionen von Bcl-2 innerhalb der verschiedenen Subgruppen.....  | 50 |
| Tabelle 18 Korrelationsergebnisse zwischen Marker Bcl-2 und den einzelnen PR-Spleißvarianten.. ....  | 50 |
| Tabelle 19 Anteil (in%) an Expressionen für STK-15 innerhalb der verschiedenen Subgruppen.....   | 51 |
| Tabelle 20 Korrelationsergebnisse zwischen Marker STK-15 und den einzelnen PR-Spleißvarianten .....  | 52 |
| Tabelle 21 Anteil (in%) an Expressionen für Mybl-2 innerhalb der verschiedenen Subgruppen.....   | 52 |

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 22 Korrelationsergebnisse zwischen Marker Mybl-2 und den einzelnen PR-Spleißvarianten .....        | 53 |
| Tabelle 23 Anteil (in%) an Expressionen für Cathepsin L2 innerhalb der verschiedenen Subgruppen.....       | 54 |
| Tabelle 24 Korrelationsergebnisse zwischen Marker Cathepsin-L2 und den einzelnen PR-Spleißvarianten. ....  | 54 |
| Tabelle 25 Anteil (in%) an Expressionen für Stromelysin-3 innerhalb der verschiedenen Subgruppen.....      | 55 |
| Tabelle 26 Korrelationsergebnisse zwischen Marker Stromelysin-3 und den einzelnen PR-Spleißvarianten ..... | 55 |
| Tabelle 27 Anteil (in%) an Expressionen für Ki-67 innerhalb der verschiedenen Subgruppen.....              | 56 |
| Tabelle 28 Korrelationsergebnisse zwischen Marker Ki-67 und den einzelnen PR-Spleißvarianten .....         | 57 |
| Tabelle 29 Anteil (in%) an Expressionen für Cyclin B1 innerhalb der verschiedenen Subgruppen.....          | 57 |
| Tabelle 30 Korrelationsergebnisse zwischen Marker Cyclin B1 und den einzelnen PR-Spleißvarianten .....     | 58 |
| Tabelle 31 Anteil (in%) an Expressionen für Her2neu innerhalb der verschiedenen Subgruppen.....            | 59 |
| Tabelle 32 Korrelationsergebnisse zwischen Marker Her2neu und den einzelnen PR-Spleißvarianten .....       | 59 |
| Tabelle 33 Anteil (in%) an Expressionen für p21/WAF innerhalb der verschiedenen Subgruppen.....            | 60 |
| Tabelle 34 Korrelationsergebnisse zwischen Marker p21/WAF und den einzelnen PR-Spleißvarianten .....       | 61 |
| Tabelle 35 Anteil (in%) an Expressionen für GRB-7 innerhalb der verschiedenen Subgruppen.....              | 61 |
| Tabelle 36 Korrelationsergebnisse zwischen Marker GRB-7 und den einzelnen PR-Spleißvarianten .....         | 62 |

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 37 Anteil (in%) an Expressionen für CD-68 innerhalb der verschiedenen Subgruppen.....                                | 62 |
| Tabelle 38 Korrelationsergebnisse zwischen Marker CD-68 und den einzelnen PR-Spleißvarianten .....                           | 63 |
| Tabelle 39 Anteil (in%) an positiven Proben (also positive Expression) für BAG-1 innerhalb der verschiedenen Subgruppen..... | 64 |
| Tabelle 40 Korrelationsergebnisse zwischen Marker BAG-1 und den einzelnen PR-Spleißvarianten .....                           | 64 |
| Tabelle 41 Anteil (in%) an Expressionen für SCUBE-2 innerhalb der verschiedenen Subgruppen.....                              | 65 |
| Tabelle 42 Korrelationsergebnisse zwischen Marker SCUBE-2 und den einzelnen PR-Spleißvarianten .....                         | 65 |
| Tabelle 43 Anteil (in%) an Expressionen für E-Cadherin innerhalb der verschiedenen Subgruppen.....                           | 66 |
| Tabelle 44 Korrelationsergebnisse zwischen Marker E-Cadherin und den einzelnen PR-Spleißvarianten. ....                      | 67 |
| Tabelle 45 Anteil (in%) an Expressionen für PTEN innerhalb der verschiedenen Subgruppen.....                                 | 67 |
| Tabelle 46 Korrelationsergebnisse zwischen Marker PTEN und den einzelnen PR-Spleißvarianten .....                            | 68 |
| Tabelle 47 Anteil (in%) an Expressionen für GSTM-1 innerhalb der verschiedenen Subgruppen.....                               | 68 |
| Tabelle 48 Korrelationsergebnisse zwischen Marker GSTM-1 und den einzelnen PR-Spleißvarianten .....                          | 69 |
| Tabelle 49 Korrelation der PR-Spleißvarianten mit "pro-Karzinom" Markern.....  | 70 |
| Tabelle 50 Korrelation der PR-Splicevarianten mit "contra-Karzinom" Markern .....  | 71 |



## 11. Literaturverzeichnis

- Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study (2003). In: *The Lancet* 362 (9382), S. 419–427.
- Aaltonen, K.; Amini, R-M; Heikkilä, P.; Aittomäki, K.; Tamminen, A.; Nevanlinna, H.; Blomqvist, C. (2009): High cyclin B1 expression is associated with poor survival in breast cancer. In: *Br J Cancer* 100 (7), S. 1055–1060.
- Abbas, Tarek; Dutta, Anindya (2009): p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. In: *Nat Rev Cancer* 9 (6), S. 400–414.
- Acs, G.; Lawton, T. J.; Rebbeck, T. R.; LiVolsi, V. A.; Zhang, P. J. (2001): Differential expression of E-cadherin in lobular and ductal neoplasms of the breast and its biologic and diagnostic implications. In: *Am. J. Clin. Pathol.* 115 (1), S. 85–98.
- Akiyama, T.; Sudo, C.; Ogawara, H.; Toyoshima, K.; Yamamoto, T. (1986): The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. In: *Science* 232 (4758), S. 1644–1646.
- Alló, Mariano; Buggiano, Valeria; Fededa, Juan P.; Petrillo, Ezequiel; Schor, Ignacio; La Mata, Manuel de et al. (2009): Control of alternative splicing through siRNA-mediated transcriptional gene silencing. In: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 (7), S. 717–724.
- Alpy, Fabien; Boulay, Anne; Moog-Lutz, Christel; Andarawewa, Kumari L.; Degot, Sébastien; Stoll, Isabelle et al. (2003): Metastatic lymph node 64 (MLN64), a gene overexpressed in breast cancers, is regulated by Sp/KLF transcription factors. In: *Oncogene* 22 (24), S. 3770–3780.
- Alt, F. W.; Bothwell, A. L.; Knapp, M.; Siden, E.; Mather, E.; Koshland, M.; Baltimore, D. (1980): Synthesis of secreted and membrane-bound immunoglobulin mu heavy chains is directed by mRNAs that differ at their 3' ends. In: *Cell* 20 (2), S. 293–301.
- Amicis, F. de; Zupo, S.; Panno, M. L.; Malivindi, R.; Giordano, F.; Barone, I. et al. (2009): Progesterone receptor B recruits a repressor complex to a half-PRE site of the estrogen receptor alpha gene promoter. In: *Mol. Endocrinol.* 23 (4), S. 454–465.
- Anderson, H.; Hills, M.; Zabaglo, L.; A'Hern, R.; Leary, A. F.; Haynes, B. P. et al. (2011): Relationship between estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2 and Ki67 expression and efficacy of aromatase inhibitors in advanced breast cancer. In: *Annals of Oncology* 22 (8), S. 1770–1776.
- Aranda, A.; Pascual, A. (2001): Nuclear hormone receptors and gene expression. In: *Physiol. Rev.* 81 (3), S. 1269–1304.
- Arnould, L.; Arveux, P.; Couturier, J.; Gelly-Marty, M.; Loustalot, C.; Ettore, F. et al. (2007): Pathologic Complete Response to Trastuzumab-Based Neoadjuvant Therapy Is Related to the Level of HER-2 Amplification. In: *Clinical Cancer Research* 13 (21), S. 6404–6409.
- Atchley, D. P.; Albarracin, C. T.; Lopez, A.; Valero, V.; Amos, C. I.; Gonzalez-Angulo, A. M. et al. (2008): Clinical and Pathologic Characteristics of Patients With BRCA-Positive

- and BRCA-Negative Breast Cancer. In: *Journal of Clinical Oncology* 26 (26), S. 4282–4288.
- Bain, D. L. (2001): The N-terminal Region of Human Progesterone B-receptors. BIOPHYSICAL AND BIOCHEMICAL COMPARISON TO A-RECEPTORS. In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (26), S. 23825–23831.
- Balañá, M. E.; Lupu, R.; Labriola, L.; Charreau, E. H.; Elizalde, P. V. (1999): Interactions between progestins and heregulin (HRG) signaling pathways: HRG acts as mediator of progestins proliferative effects in mouse mammary adenocarcinomas. In: *Oncogene* 18 (46), S. 6370–6379.
- Balleine, R. L. (1999): Coexpression of Alternatively Spliced Estrogen and Progesterone Receptor Transcripts in Human Breast Cancer. In: *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 84 (4), S. 1370–1377.
- Bardou, V.-J (2003): Progesterone Receptor Status Significantly Improves Outcome Prediction Over Estrogen Receptor Status Alone for Adjuvant Endocrine Therapy in Two Large Breast Cancer Databases. In: *Journal of Clinical Oncology* 21 (10), S. 1973–1979.
- Basset, P.; Bellocq, J. P.; Wolf, C.; Stoll, I.; Hutin, P.; Limacher, J. M. et al. (1990): A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. In: *Nature* 348 (6303), S. 699–704.
- Beguelin, W.; Diaz Flaquer, M. C.; Proietti, C. J.; Cayrol, F.; Rivas, M. A.; Tkach, M. et al. (2010): Progesterone Receptor Induces ErbB-2 Nuclear Translocation To Promote Breast Cancer Growth via a Novel Transcriptional Effect: ErbB-2 Function as a Coactivator of Stat3. In: *Molecular and Cellular Biology* 30 (23), S. 5456–5472.
- Berx, G.; Staes, K.; van Hengel, J.; Molemans, F.; Bussemakers, M. J.; van Bokhoven, A.; van Roy, F. (1995): Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDH1). In: *Genomics* 26 (2), S. 281–289.
- Bilimoria, M. M.; Morrow, M. (1995): The woman at increased risk for breast cancer: evaluation and management strategies. In: *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 45 (5), S. 263–278.
- Black, Douglas L. (2003): Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. In: *Annu. Rev. Biochem.* 72, S. 291–336.
- Borley, Annabel C.; Hiscox, Stephen; Gee, Julia; Smith, Chris; Shaw, Victoria; Barrett-Lee, Peter; Nicholson, Robert I. (2008): Anti-oestrogens but not oestrogen deprivation promote cellular invasion in intercellular adhesion-deficient breast cancer cells. In: *Breast Cancer Res* 10 (6), S. R103.
- Bose, Shikha; Crane, Allison; Hibshoosh, Hanina; Mansukhani, Mahesh; Sandweis, Lynn; Parsons, Ramon (2002): Reduced expression of PTEN correlates with breast cancer progression. In: *Hum. Pathol.* 33 (4), S. 405–409.
- Bracke, M. E.; Charlier, C.; Bruyneel, E. A.; Labit, C.; Mareel, M. M.; Castronovo, V. (1994): Tamoxifen restores the E-cadherin function in human breast cancer MCF-7/6 cells and suppresses their invasive phenotype. In: *Cancer Res.* 54 (17), S. 4607–4609.

- Bühl, Achim; Zöfel, Peter (2000): SPSS Version 10. Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows ; [Analysen anhand von Fallstudien ; mit dem Modul Tables ; neu: ordinale Regression]. 7. Aufl. München, Boston [u.a.]: Addison-Wesley.
- Callagy, Grace M.; Webber, Mark J.; Pharoah, Paul D. P.; Caldas, Carlos (2008): Meta-analysis confirms BCL2 is an independent prognostic marker in breast cancer. In: *BMC Cancer* 8 (1), S. 153.
- Casslen, B. (1998): Transforming growth factor beta1 in the human endometrium. Cyclic variation, increased expression by estradiol and progesterone, and regulation of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 [In Process Citation]. In: *Biology of Reproduction* 58 (6), S. 1343–1350.
- Chae, Seoung Wan; Sohn, Jin Hee; Kim, Dong-Hoon; Choi, Yoon Jung; Park, Yong Lai; Kim, Kyungeun et al. (2011): Overexpressions of Cyclin B1, cdc2, p16 and p53 in Human Breast Cancer: The Clinicopathologic Correlations and Prognostic Implications. In: *Yonsei Med J* 52 (3), S. 445.
- Cheng, C.-J; Lin, Y.-C; Tsai, M.-T; Chen, C.-S; Hsieh, M.-C; Chen, C.-L; Yang, R.-B (2009): SCUBE2 Suppresses Breast Tumor Cell Proliferation and Confers a Favorable Prognosis in Invasive Breast Cancer. In: *Cancer Research* 69 (8), S. 3634–3641.
- Cheng, Chun-Wen; Yu, Jyh-Cherng; Wang, Hsiao-Wei; Huang, Chiun-Sheng; Shieh, Jia-Ching; Fu, Yi-Ping et al. (2010): The clinical implications of MMP-11 and CK-20 expression in human breast cancer. In: *Clinica Chimica Acta* 411 (3-4), S. 234–241.
- Colditz, G. A.; Rosner, B. A.; Chen, W. Y.; Holmes, M. D.; Hankinson, S. E. (2004): Risk Factors for Breast Cancer According to Estrogen and Progesterone Receptor Status. In: *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 96 (3), S. 218–228.
- Cork, David M. W.; Lennard, Thomas W. J.; Tyson-Capper, Alison J. (2008): Alternative splicing and the progesterone receptor in breast cancer. In: *Breast Cancer Res.* 10 (3), S. 207.
- Cork, David M. W.; Lennard, Thomas W. J.; Tyson-Capper, Alison J. (2012): Progesterone receptor (PR) variants exist in breast cancer cells characterised as PR negative. In: *Tumour Biol.* 33 (6), S. 2329–2340.
- Coussens, L.; Yang-Feng, T. L.; Liao, Y. C.; Chen, E.; Gray, A.; McGrath, J. et al. (1985): Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. In: *Science* 230 (4730), S. 1132–1139.
- Cui, Xiaojiang; Zhang, Ping; Deng, Wanleng; Oesterreich, Steffi; Lu, Yiling; Mills, Gordon B.; Lee, Adrian V. (2003): Insulin-like growth factor-I inhibits progesterone receptor expression in breast cancer cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway: progesterone receptor as a potential indicator of growth factor activity in breast cancer. In: *Mol. Endocrinol.* 17 (4), S. 575–588.
- Cutress, Ramsey I.; Townsend, Paul A.; Sharp, Adam; Maison, Anna; Wood, Lynn; Lee, Ron et al. (2003): The nuclear BAG-1 isoform, BAG-1L, enhances oestrogen-dependent transcription. In: *Oncogene* 22 (32), S. 4973–4982.

- da Silva, B. B.; dos Santos, A. R.; Pires, C. G.; Correa-Lima, M. A.; Pereira-Filho, J. D. D.; dos Santos, L. G. et al. (2010): E-cadherin expression in estrogen receptor-positive and negative breast carcinomas of postmenopausal women. In: *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 31 (1), S. 90–93.
- Daidone, M. G.; Luisi, A.; Veneroni, S.; Benini, E.; Silvestrini, R. (1999): Clinical studies of Bcl-2 and treatment benefit in breast cancer patients. In: *Endocr. Relat. Cancer* 6 (1), S. 61–68.
- Daly, R. J. (1998): The Grb7 family of signalling proteins. In: *Cell. Signal.* 10 (9), S. 613–618.
- Daniel, Andrea R.; Qiu, Ming; Faivre, Emily J.; Ostrander, Julie Hanson; Skildum, Andrew; Lange, Carol A. (2007): Linkage of progestin and epidermal growth factor signaling: phosphorylation of progesterone receptors mediates transcriptional hypersensitivity and increased ligand-independent breast cancer cell growth. In: *Steroids* 72 (2), S. 188–201.
- Dawson, S-J; Makretsov, N.; Blows, F. M.; Driver, K. E.; Provenzano, E.; Le Quesne, J. et al. (2010): BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. In: *Br. J. Cancer* 103 (5), S. 668–675.
- DeNardo, David G.; Coussens, Lisa M. (2007): Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. In: *Breast Cancer Res* 9 (4), S. 212.
- Dong, L. Q.; Porter, S.; Hu, D.; Liu, F. (1998): Inhibition of hGrb10 binding to the insulin receptor by functional domain-mediated oligomerization. In: *J. Biol. Chem.* 273 (28), S. 17720–17725.
- Eiró, Noemí; Pidal, Iván; Fernandez-Garcia, Belen; Junquera, Sara; Lamelas, Maria L.; del Casar, José M. et al. (2012): Impact of CD68/(CD3+CD20) Ratio at the Invasive Front of Primary Tumors on Distant Metastasis Development in Breast Cancer. In: *PLoS ONE* 7 (12), S. e52796.
- el-Deiry, W. S.; Tokino, T.; Velculescu, V. E.; Levy, D. B.; Parsons, R.; Trent, J. M. et al. (1993): WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. In: *Cell* 75 (4), S. 817–825.
- Elledge, R. M.; Green, S.; Pugh, R.; Allred, D. C.; Clark, G. M.; Hill, J. et al. (2000): Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immuno-histochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. In: *Int. J. Cancer* 89 (2), S. 111–117.
- Feilotter, H. E.; Coulon, V.; McVeigh, J. L.; Boag, A. H.; Dorion-Bonnet, F.; Duboué, B. et al. (1999): Analysis of the 10q23 chromosomal region and the PTEN gene in human sporadic breast carcinoma. In: *Br. J. Cancer* 79 (5-6), S. 718–723.

- Foekens, J. A.; Kos, J.; Peters, H. A.; Krasovec, M.; Look, M. P.; Cimerman, N. et al. (1998): Prognostic significance of cathepsins B and L in primary human breast cancer. In: *J. Clin. Oncol.* 16 (3), S. 1013–1021.
- Frixen, U. H.; Behrens, J.; Sachs, M.; Eberle, G.; Voss, B.; Warda, A. et al. (1991): E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. In: *J. Cell Biol.* 113 (1), S. 173–185.
- Fujita, Naoyuki; Jaye, David L.; Kajita, Masahiro; Geigerman, Cissy; Moreno, Carlos S.; Wade, Paul A. (2003): MTA3, a Mi-2/NuRD complex subunit, regulates an invasive growth pathway in breast cancer. In: *Cell* 113 (2), S. 207–219.
- Gamallo, C.; Palacios, J.; Suarez, A.; Pizarro, A.; Navarro, P.; Quintanilla, M.; Cano, A. (1993): Correlation of E-cadherin expression with differentiation grade and histological type in breast carcinoma. In: *Am. J. Pathol.* 142 (4), S. 987–993.
- Gapstur, S. M.; Morrow, M.; Sellers, T. A. (1999): Hormone replacement therapy and risk of breast cancer with a favorable histology: results of the Iowa Women's Health Study. In: *JAMA* 281 (22), S. 2091–2097.
- Garcia, J. M.; Silva, J. M.; Dominguez, G.; Gonzalez, R.; Navarro, A.; Carretero, L. et al. (1999): Allelic loss of the PTEN region (10q23) in breast carcinomas of poor pathophenotype. In: *Breast Cancer Res. Treat.* 57 (3), S. 237–243.
- Gee, Julia M. W.; Robertson, John F. R.; Ellis, Ian O.; Willsher, Peter; McClelland, Richard A.; Hoyle, Helen B. et al. (1994): Immunocytochemical localization of BCL-2 protein in human breast cancers and its relationship to a series of prognostic markers and response to endocrine therapy. In: *Int. J. Cancer* 59 (5), S. 619–628.
- Giangrande, P. H.; Pollio, G.; McDonnell, D. P. (1997): Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. In: *J. Biol. Chem.* 272 (52), S. 32889–32900.
- Ginestier, Christophe; Cervera, Nathalie; Finetti, Pascal; Esteyries, Séverine; Esterni, Benjamin; Adélaïde, José et al. (2006): Prognosis and gene expression profiling of 20q13-amplified breast cancers. In: *Clin. Cancer Res.* 12 (15), S. 4533–4544.
- Giulianelli, S.; Vaque, J. P.; Soldati, R.; Wargon, V.; Vanzulli, S. I.; Martins, R. et al. (2012): Estrogen Receptor Alpha Mediates Progestin-Induced Mammary Tumor Growth by Interacting with Progesterone Receptors at the Cyclin D1/MYC Promoters. In: *Cancer Research* 72 (9), S. 2416–2427.
- Gnant, Michael; Harbeck, Nadia; Thomssen, Christoph (2011): St. Gallen 2011: Summary of the Consensus Discussion. In: *Breast Care* 6 (2), S. 136–141.
- Goldberg, Jessica I.; Borgen, Patrick I. (2006): Breast cancer susceptibility testing: past, present and future. In: *Expert Rev Anticancer Ther* 6 (8), S. 1205–1214.
- Goldhirsch, A.; Wood, W. C.; Coates, A. S.; Gelber, R. D.; Thurlimann, B.; Senn, H.-J (2011): Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. In: *Annals of Oncology* 22 (8), S. 1736–1747.

- Goncalves, Rodrigo; Bose, Ron (2013): Using multigene tests to select treatment for early-stage breast cancer. In: *J Natl Compr Canc Netw* 11 (2), S. 174–182.
- Graeser, M.; Bosse, K.; Brosig, M.; Engel, C.; Schmutzler, R. K. (2009): Association of hormone receptor status with grading, age of onset, and tumor size in BRCA1-associated breast cancer. In: *Virchows Arch* 454 (5), S. 519–524.
- Graham, J. D.; Yeates, C.; Balleine, R. L.; Harvey, S. S.; Milliken, J. S.; Bilous, A. M.; Clarke, C. L. (1995): Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. In: *Cancer Res.* 55 (21), S. 5063–5068.
- Graham, J. Dinny; Yager, Melissa L.; Hill, Hazel D.; Byth, Karen; O'Neill, Geraldine M.; Clarke, Christine L. (2005): Altered progesterone receptor isoform expression remodels progestin responsiveness of breast cancer cells. In: *Mol. Endocrinol.* 19 (11), S. 2713–2735.
- Graw, Jochen (2010): Genetik, Springer DE, S.92-93.
- Groshong, S. D. (1997): Biphasic Regulation of Breast Cancer Cell Growth by Progesterone: Role of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors, p21 and p27Kip1. In: *Molecular Endocrinology* 11 (11), S. 1593–1607.
- Hagan, Christy R.; Daniel, Andrea R.; Dressing, Gwen E.; Lange, Carol A. (2012): Role of phosphorylation in progesterone receptor signaling and specificity. In: *Molecular and Cellular Endocrinology* 357 (1-2), S. 43–49.
- Hammond, M. E. H.; Hayes, D. F.; Dowsett, M.; Allred, D. C.; Hagerty, K. L.; Badve, S. et al. (2010): American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. In: *Journal of Clinical Oncology* 28 (16), S. 2784–2795.
- Hanada, Norihisa; Lo, Hui-Wen; Day, Chi-Ping; Pan, Yong; Nakajima, Yusuke; Hung, Mien-Chie (2006): Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor. In: *Mol. Carcinog.* 45 (1), S. 10–17.
- Han, D. C.; Shen, T. L.; Guan, J. L. (2000): Role of Grb7 targeting to focal contacts and its phosphorylation by focal adhesion kinase in regulation of cell migration. In: *J. Biol. Chem.* 275 (37), S. 28911–28917.
- Han, D. C.; Shen, T. L.; Guan, J. L. (2001): The Grb7 family proteins: structure, interactions with other signaling molecules and potential cellular functions. In: *Oncogene* 20 (44), S. 6315–6321.
- Hanley, K. Z.; Siddiqui, M. T.; Lawson, D.; Cohen, C.; Nassar, A. (2009): Evaluation of new monoclonal antibodies in detection of estrogen receptor, progesterone receptor, and Her2 protein expression in breast carcinoma cell block sections using conventional microscopy and quantitative image analysis. In: *Diagn. Cytopathol.* 37 (4), S. 251–257.
- Harvey, J. M.; Clark, G. M.; Osborne, C. K.; Allred, D. C. (1999): Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting

- response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. In: *J. Clin. Oncol.* 17 (5), S. 1474–1481.
- Hewitt, S. C.; Korach, K. S. (2000): Progesterone action and responses in the alphaERKO mouse. In: *Steroids* 65 (10-11), S. 551–557.
- Hill, Krista K.; Roemer, Sarah C.; Churchill, Mair E.A; Edwards, Dean P. (2012): Structural and functional analysis of domains of the progesterone receptor. In: *Molecular and Cellular Endocrinology* 348 (2), S. 418–429.
- Hirata, Shuji; Shoda, Tomoko; Kato, Junzo; Hoshi, Kazuhiko (2000): The Novel Isoform of the Progesterone Receptor cDNA in the Human Testis and Detection of its mRNA in the Human Uterine Endometrium. In: *Oncology* 59 (Suppl. 1), S. 39–44.
- Hirata, Shuji; Shoda, Tomoko; Kato, Junzo; Hoshi, Kazuhiko (2002a): Novel isoforms of the mRNA for human female sex steroid hormone receptors. In: *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 83 (1-5), S. 25–30.
- Hirata, Shuji; Shoda, Tomoko; Kato, Junzo; Hoshi, Kazuhiko (2002b): The novel exon, exon T, of the human progesterone receptor gene and the genomic organization of the gene. In: *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 80 (3), S. 365–367.
- Hisatomi, Hisashi; Kohno, Norio; Wakita, Kazuyuki; Nagao, Kumi; Hirata, Hiroyuki; Hikiji, Kazumasa; Harada, Shoji (2003): Novel alternatively spliced variant with a deletion of 52 BP in exon 6 of the progesterone receptor gene is observed frequently in breast cancer tissues. In: *Int. J. Cancer* 105 (2), S. 182–185.
- Hodgson, J. Graeme; Chin, Koei; Collins, Colin; Gray, Joe W. (2003): Genome amplification of chromosome 20 in breast cancer. In: *Breast Cancer Res. Treat.* 78 (3), S. 337–345.
- Höhfeld, J. (1998): Regulation of the heat shock conjugate Hsc70 in the mammalian cell: the characterization of the anti-apoptotic protein BAG-1 provides novel insights. In: *Biol. Chem.* 379 (3), S. 269–274.
- Honma, Naoko; Horii, Rie; Iwase, Takuji; Saji, Shigehira; Younes, Mamoun; Ito, Yoshinori; Akiyama, Futoshi (2013): Ki-67 evaluation at the hottest spot predicts clinical outcome of patients with hormone receptor-positive/HER2-negative breast cancer treated with adjuvant tamoxifen monotherapy. In: *Breast Cancer*.
- Hopp, Torsten A.; Weiss, Heidi L.; Hilsenbeck, Susan G.; Cui, Yukun; Allred, D. Craig; Horwitz, Kathryn B.; Fuqua, Suzanne A. W. (2004): Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates. In: *Clin. Cancer Res.* 10 (8), S. 2751–2760.
- Horwitz, K. B. (1992): The molecular biology of RU486. Is there a role for antiprogestins in the treatment of breast cancer? In: *Endocr. Rev.* 13 (2), S. 146–163.
- Horwitz, K. B.; McGuire, W. L. (1975): Predicting response to endocrine therapy in human breast cancer: a hypothesis. In: *Science* 189 (4204), S. 726–727.
- Ikuero, Stephen O.; Kuczyk, Markus A.; Mengel, Michael; van der Heyde, Eyck; Shittu, Olayiwola B.; Vaske, Bernhard et al. (2006): Alteration of subcellular and cellular

- expression patterns of cyclin B1 in renal cell carcinoma is significantly related to clinical progression and survival of patients. In: *Int. J. Cancer* 119 (4), S. 867–874.
- Itoh, Hiroko; Kishore, Annavarapu Hari; Lindqvist, Annika; Rogers, David E.; Word, R. Ann (2012): Transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) and progesterone regulate matrix metalloproteinases (MMP) in human endometrial stromal cells. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97 (6), S. E888-97.
- Jansohn, Monika (2006): Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularebiologische Labor, Spektrum-Akademischer Verlag, S.68-92, S.149-170.
- Jovicić-Milentijević, M.; Ilić, R.; Katić, V.; Zivković, V. (2004): Correlation of steroid hormone receptor status with histological and nuclear grading in breast carcinoma. In: *J BUON* 9 (2), S. 173–177.
- Kastner, P.; Krust, A.; Turcotte, B.; Stropp, U.; Tora, L.; Gronemeyer, H.; Chambon, P. (1990): Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. In: *EMBO J.* 9 (5), S. 1603–1614.
- Kirkegaard, Tove; Witton, Caroline J.; McGlynn, Liane M.; Tovey, Sian M.; Dunne, Barbara; Lyon, Alison; Bartlett, John M. S. (2005): AKT activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. In: *J. Pathol.* 207 (2), S. 139–146.
- Knauer, Michael; Mook, Stella; Rutgers, Emiel J. T.; Bender, Richard A.; Hauptmann, Michael; van de Vijver, Marc J. et al. (2010): The predictive value of the 70-gene signature for adjuvant chemotherapy in early breast cancer. In: *Breast Cancer Res. Treat.* 120 (3), S. 655–661.
- Köhrmann, Andrea; Kammerer, Ulrike; Kapp, Michaela; Dietl, Johannes; Anacker, Jelena (2009): Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. In: *BMC Cancer* 9 (1), S. 188.
- Konduri, S. D.; Medisetty, R.; Liu, W.; Kaiparettu, B. A.; Srivastava, P.; Brauch, H. et al. (2010): Mechanisms of estrogen receptor antagonism toward p53 and its implications in breast cancer therapeutic response and stem cell regulation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (34), S. 15081–15086.
- Kos, J.; Lah, T. T. (1998): Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer (review). In: *Oncol. Rep.* 5 (6), S. 1349–1361.
- Kreienberg, Rolf (2010): Mammakarzinom Interdisziplinär. 4. Aufl. Berlin ;, New York: Springer.
- Kreiger, N.; King, W. D.; Rosenberg, L.; Clarke, E. A.; Palmer, J. R.; Shapiro, S. (1991): Steroid receptor status and the epidemiology of breast cancer. In: *Ann Epidemiol* 1 (6), S. 513–523.



- Kühling, Heidi; Alm, Per; Olsson, Håkan; Fernö, Mårten; Baldetorp, Bo; Parwaresch, Reza; Rudolph, Pierre (2003): Expression of cyclins E, A, and B, and prognosis in lymph node-negative breast cancer. In: *J. Pathol.* 199 (4), S. 424–431.
- Labriola, Leticia; Salatino, Mariana; Proietti, Cecilia J.; Pecci, Adalí; Coso, Omar A.; Kornblihtt, Alberto R. et al. (2003): Heregulin induces transcriptional activation of the progesterone receptor by a mechanism that requires functional ErbB-2 and mitogen-activated protein kinase activation in breast cancer cells. In: *Mol. Cell. Biol.* 23 (3), S. 1095–1111.
- Lacroix, M. (2006): p53 and breast cancer, an update. In: *Endocrine Related Cancer* 13 (2), S. 293–325.
- Lah, T. T.; Kalman, E.; Najjar, D.; Gorodetsky, E.; Brennan, P.; Somers, R.; Daskal, I. (2000): Cells producing cathepsins D, B, and L in human breast carcinoma and their association with prognosis. In: *Hum. Pathol.* 31 (2), S. 149–160.
- Lander, Eric S.; Linton, Lauren M.; Birren, Bruce; Nusbaum, Chad; Zody, Michael C.; Baldwin, Jennifer et al. (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. In: *Nature* 409 (6822), S. 860–921.
- Lee, Andrew H. S. (2005): Prediction of cancer outcome with microarrays. In: *Lancet* 365 (9472), S. 1685; author reply 1686.
- Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF; Deutschen Krebsgesellschaft e.V.; Deutschen Krebshilfe e.V. (Hg.) (2012): Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Online verfügbar unter <http://www.awmf.org/leitlinien/aktuelle-leitlinien.html>.
- Leygue, Etienne; Dotzlaw, Helmut; Watson, Peter H.; Murphy, Leigh C. (1996): Identification of Novel Exon-Deleted Progesterone Receptor Variant mRNAs in Human Breast Tissue. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 228 (1), S. 63–68.
- Li, Hongbing; Sánchez-Torres, Juan; del Carpio, Alan F.; Nogales-González, Aitor; Molina-Ortiz, Patricia; Moreno, María J. et al. (2005): The adaptor Grb7 is a novel calmodulin-binding protein: functional implications of the interaction of calmodulin with Grb7. In: *Oncogene* 24 (26), S. 4206–4219.
- Li, J.; Yen, C.; Liaw, D.; Podsypanina, K.; Bose, S.; Wang, S. I. et al. (1997): PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. In: *Science* 275 (5308), S. 1943–1947.
- Linke, Steven P.; Bremer, Troy M.; Herold, Christopher D.; Sauter, Guido; Diamond, Cornelius (2006): A multimarker model to predict outcome in tamoxifen-treated breast cancer patients. In: *Clin. Cancer Res.* 12 (4), S. 1175–1183.
- Lin, Shengrong; Fu, Xiang-Dong (2007): SR proteins and related factors in alternative splicing. In: *Adv. Exp. Med. Biol.* 623, S. 107–122.
- Lin, Y.-C.; Chen, C.-C.; Cheng, C.-J.; Yang, R.-B (2011): Domain and Functional Analysis of a Novel Breast Tumor Suppressor Protein, SCUBE2. In: *Journal of Biological Chemistry* 286 (30), S. 27039–27047.

- Liu, Wensheng; Ip, Margot M.; Podgorsak, Matthew B.; Das, Gokul M. (2009): Disruption of estrogen receptor  $\alpha$ -p53 interaction in breast tumors: a novel mechanism underlying the anti-tumor effect of radiation therapy. In: *Breast Cancer Res Treat* 115 (1), S. 43–50.
- Liu, Wensheng; Konduri, Santhi D.; Bansal, Sanjay; Nayak, Bijaya K.; Rajasekaran, Sigrid A.; Karuppayil, Sankunny M. et al. (2006): Estrogen receptor- $\alpha$  binds p53 tumor suppressor protein directly and represses its function. In: *J. Biol. Chem.* 281 (15), S. 9837–9840.
- Li, Xiaotao; Lonard, David M.; O'Malley, Bert W. (2004): A contemporary understanding of progesterone receptor function. In: *Mech. Ageing Dev.* 125 (10-11), S. 669–678.
- Mahmoud, S. M. A.; Lee, A. H. S.; Paish, E. C.; Macmillan, R. D.; Ellis, I. O.; Green, A. R. (2012): Tumour-infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer. In: *Journal of Clinical Pathology* 65 (2), S. 159–163.
- Malamou-Mitsi, V.; Gogas, H.; Dafni, U.; Bourli, A.; Fillipidis, T.; Sotiropoulou, M. et al. (2006): Evaluation of the prognostic and predictive value of p53 and Bcl-2 in breast cancer patients participating in a randomized study with dose-dense sequential adjuvant chemotherapy. In: *Ann. Oncol.* 17 (10), S. 1504–1511.
- Malvezzi, M.; Bertuccio, P.; Levi, F.; La Vecchia, C.; Negri, E. (2012): European cancer mortality predictions for the year 2012. In: *Annals of Oncology* 23 (4), S. 1044–1052.
- Margolis, B.; Silvennoinen, O.; Comoglio, F.; Roonprapunt, C.; Skolnik, E.; Ullrich, A.; Schlessinger, J. (1992): High-efficiency expression/cloning of epidermal growth factor-receptor-binding proteins with Src homology 2 domains. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (19), S. 8894–8898.
- Martinez-Contreras, Rebeca; Cloutier, Philippe; Shkreta, Lulzim; Fisette, Jean-François; Revil, Timothée; Chabot, Benoit (2007): hnRNP proteins and splicing control. In: *Adv. Exp. Med. Biol.* 623, S. 123–147.
- Mathieu, M-C; Rouzier, R.; Llombart-Cussac, A.; Sideris, L.; Koscielny, S.; Travagli, J. P. et al. (2004): The poor responsiveness of infiltrating lobular breast carcinomas to neoadjuvant chemotherapy can be explained by their biological profile. In: *Eur. J. Cancer* 40 (3), S. 342–351.
- Matlin, Arianne J.; Clark, Francis; Smith, Christopher W. J. (2005): Understanding alternative splicing: towards a cellular code. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (5), S. 386–398.
- McGuire, W. L.; Chamness, G. C.; Fuqua, S. A. (1991): Estrogen receptor variants in clinical breast cancer. In: *Mol. Endocrinol.* 5 (11), S. 1571–1577.
- McGuire, W. L.; Clark, G. M.; Dressler, L. G.; Owens, M. A. (1986): Role of steroid hormone receptors as prognostic factors in primary breast cancer. In: *NCI Monogr* (1), S. 19–23.
- Misao, Ryou; Nakanishi, Yoshihito; Sun, Wen-Shu; Iwagaki, Shigenori; Fujimoto, Jiro; Tamaya, Teruhiko (2000): Identification of Exon-Deleted Progesterone Receptor mRNAs in Human Uterine Endometrial Cancers. In: *Oncology* 58 (1), S. 60–65.

- Misao, Ryou; Sun, Wen-Shu; Iwagaki, Shigenori; Fujimoto, Jiro; Tamaya, Teruhiko (1998): Identification of Various Exon-Deleted Progesterone Receptor mRNAs in Human Endometrium and Ovarian Endometriosis. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 252 (2), S. 302–306.
- Mishra, Anjali; Chandra, Richa; Mehrotra, Prateek Kumar; Bajpai, Prachi; Agrawal, Deepa (2011): Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphism and response to neoadjuvant chemotherapy (CAF) in breast cancer patients. In: *Surg Today* 41 (4), S. 471–476.
- Misrahi, M.; Venencie, P. Y.; Saugier-veber, P.; Sar, S.; Dessen, P.; Milgrom, E. (1993): Structure of the human progesterone receptor gene. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1216 (2), S. 289–292.
- Miyoshi, Yasuo; Iwao, Kyoko; Egawa, Chiyomi; Noguchi, Shinzaburo (2001): Association of centrosomal kinase STK15/BTAK mRNA expression with chromosomal instability in human breast cancers. In: *Int. J. Cancer* 92 (3), S. 370–373.
- Morrow, C. S.; Smitherman, P. K.; Diah, S. K.; Schneider, E.; Townsend, A. J. (1998): Coordinated action of glutathione S-transferases (GSTs) and multidrug resistance protein 1 (MRP1) in antineoplastic drug detoxification. Mechanism of GST A1-1- and MRP1-associated resistance to chlorambucil in MCF7 breast carcinoma cells. In: *J. Biol. Chem.* 273 (32), S. 20114–20120.
- Moscatelli, D.; Rifkin, D. B. (1988): Membrane and matrix localization of proteinases: a common theme in tumor cell invasion and angiogenesis. In: *Biochim. Biophys. Acta* 948 (1), S. 67–85.
- Murakami, H.; Furihata, M.; Ohtsuki, Y.; Ogoshi, S. (1999): Determination of the prognostic significance of cyclin B1 overexpression in patients with esophageal squamous cell carcinoma. In: *Virchows Arch.* 434 (2), S. 153–158.
- Murphy, Leigh C.; Murphy, Liam J.; Shiu, Robert P.C (1988): Progestin regulation of EGF-receptor mRNA accumulation in T-47D human breast cancer cells. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 150 (1), S. 192–196.
- Musgrove, E. A.; Lee, C. S.; Sutherland, R. L. (1991): Progestins both stimulate and inhibit breast cancer cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, c-fos, and c-myc genes. In: *Mol. Cell. Biol.* 11 (10), S. 5032–5043.
- Nadler, Yasmine; Camp, Robert L.; Giltnane, Jennifer M.; Moeder, Christopher; Rimm, David L.; Kluger, Harriet M.; Kluger, Yuval (2008): Expression patterns and prognostic value of Bag-1 and Bcl-2 in breast cancer. In: *Breast Cancer Res* 10 (2), S. R35.
- Nagao, Kumi; Kohno, Norio; Wakita, Kazuyuki; Hikiji, Kazumasa; Yamamoto, Shigeki; Hirata, Hiroyuki; Hisatomi, Hisashi (2003): Expression of a novel splicing variant deleting exons 4 and 6 of the progesterone receptor gene is a rare event in breast cancer. In: *Oncol. Rep.* 10 (2), S. 305–308.
- Nielsen, Torsten O.; Hsu, Forrest D.; Jensen, Kristin; Cheang, Maggie; Karaca, Gamze; Hu, Zhiyuan et al. (2004): Immunohistochemical and clinical characterization of the

basal-like subtype of invasive breast carcinoma. In: *Clin. Cancer Res.* 10 (16), S. 5367–5374.

Nilsen, Timothy W.; Graveley, Brenton R. (2010): Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. In: *Nature* 463 (7280), S. 457–463.

Nöel, A. C.; Lefebvre, O.; Maquoi, E.; VanHoorde, L.; Chenard, M. P.; Mareel, M. et al. (1996): Stromelysin-3 expression promotes tumor take in nude mice. In: *J. Clin. Invest.* 97 (8), S. 1924–1930.

Noël, A.; Boulay, A.; Kebers, F.; Kannan, R.; Hajitou, A.; Calberg-Bacq, C. M. et al. (2000): Demonstration in vivo that stromelysin-3 functions through its proteolytic activity. In: *Oncogene* 19 (12), S. 1605–1612.

Nurismah, Md Isa; Noriah, O.; Suryati, M. Y.; Sharifah, N. A. (2008): E-cadherin expression correlates with histologic type but not tumour grade in invasive breast cancer. In: *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 9 (4), S. 699–702.

Osborne, C. K. (1998): Steroid hormone receptors in breast cancer management. In: *Breast Cancer Res. Treat.* 51 (3), S. 227–238.

Osborne, C. K.; Yochmowitz, M. G.; Knight, W. A.; McGuire, W. L. (1980): The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. In: *Cancer* 46 (12 Suppl), S. 2884–2888.

Osborne, C. Kent; Schiff, Rachel; Arpino, Grazia; Lee, Adrian Susan; Hilsenbeck, V. G. (2005): Endocrine responsiveness: understanding how progesterone receptor can be used to select endocrine therapy. In: *Breast* 14 (6), S. 458–465.

Paik, S.; Tang, G.; Shak, S.; Kim, C.; Baker, J.; Kim, W. et al. (2006): Gene Expression and Benefit of Chemotherapy in Women With Node-Negative, Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. In: *Journal of Clinical Oncology* 24 (23), S. 3726–3734.

Paik, Soonmyung; Shak, Steven; Tang, Gong; Kim, Chungyeul; Baker, Joffre; Cronin, Maureen et al. (2004): A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. In: *N. Engl. J. Med.* 351 (27), S. 2817–2826.

Pan, Qun; Shai, Ofer; Lee, Leo J.; Frey, Brendan J.; Blencowe, Benjamin J. (2008): Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. In: *Nat Genet* 40 (12), S. 1413–1415.

Penault-Llorca, Frédérique; Bilous, Michael; Dowsett, Mitch; Hanna, Wedad; Osamura, Robert Yoshiyuki; Rüschoff, Josef; van de Vijver, Marc (2009): Emerging technologies for assessing HER2 amplification. In: *Am. J. Clin. Pathol.* 132 (4), S. 539–548.

Pérez-Tenorio, G.; Stål, O. (2002): Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients. In: *Br. J. Cancer* 86 (4), S. 540–545.

Perillo, B.; Sasso, A.; Abbondanza, C.; Palumbo, G. (2000): 17beta-estradiol inhibits apoptosis in MCF-7 cells, inducing bcl-2 expression via two estrogen-responsive elements present in the coding sequence. In: *Mol. Cell. Biol.* 20 (8), S. 2890–2901.

Perou, C. M.; Sørli, T.; Eisen, M. B.; van de Rijn, M.; Jeffrey, S. S.; Rees, C. A. et al. (2000): Molecular portraits of human breast tumours. In: *Nature* 406 (6797), S. 747–752.

- Persson, I.; Weiderpass, E.; Bergkvist, L.; Bergström, R.; Schairer, C. (1999): Risks of breast and endometrial cancer after estrogen and estrogen-progestin replacement. In: *Cancer Causes Control* 10 (4), S. 253–260.
- Pfaffl, Michael Walter (2004): „Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung“. *BIO-spektrum* 1, Nr. 04: 92–95
- Pines, J.; Hunter, T. (1990): Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. In: *Nature* 346 (6286), S. 760–763.
- Poola, Indra; Speirs, Valerie (2001): Expression of alternatively spliced estrogen receptor alpha mRNAs is increased in breast cancer tissues. In: *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 78 (5), S. 459–469.
- Potemski, Piotr; Pluciennik, Elzbieta; Bednarek, Andrzej K.; Kusinska, Renata; Kubiak, Robert; Jesionek-Kupnicka, Dorota et al. (2006): Ki-67 expression in operable breast cancer: A comparative study of immunostaining and a real-time RT-PCR assay. In: *Pathology - Research and Practice* 202 (7), S. 491–495.
- Potter, J. D.; Cerhan, J. R.; Sellers, T. A.; McGovern, P. G.; Drinkard, C.; Kushi, L. R.; Folsom, A. R. (1995): Progesterone and estrogen receptors and mammary neoplasia in the Iowa Women's Health Study: how many kinds of breast cancer are there? In: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 4 (4), S. 319–326.
- Proietti, C. J.; Rosembliit, C.; Beguelin, W.; Rivas, M. A.; Diaz Flaque, M. C.; Charreau, E. H. et al. (2009): Activation of Stat3 by Heregulin/ErbB-2 through the Co-Option of Progesterone Receptor Signaling Drives Breast Cancer Growth. In: *Molecular and Cellular Biology* 29 (5), S. 1249–1265.
- Proietti, Cecilia; Salatino, Mariana; Rosembliit, Cinthia; Carnevale, Romina; Pecci, Adalí; Kornblihtt, Alberto R. et al. (2005): Progestins induce transcriptional activation of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) via a Jak- and Src-dependent mechanism in breast cancer cells. In: *Mol. Cell. Biol.* 25 (12), S. 4826–4840.
- Ravdin, P. M.; Green, S.; Dorr, T. M.; McGuire, W. L.; Fabian, C.; Pugh, R. P. et al. (1992): Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology Group study. In: *J. Clin. Oncol.* 10 (8), S. 1284–1291.
- Remmele, W.; Stegner, H. E. (1987): Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. In: *Pathologe* 8 (3), S. 138–140.
- Richer, J. K. (1998): Convergence of Progesterone with Growth Factor and Cytokine Signaling in Breast Cancer. PROGESTERONE RECEPTORS REGULATE SIGNAL TRANSDUCERS AND ACTIVATORS OF TRANSCRIPTION EXPRESSION AND ACTIVITY. In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (47), S. 31317–31326.
- Richer, J. K.; Lange, C. A.; Wierman, A. M.; Brooks, K. M.; Tung, L.; Takimoto, G. S.; Horwitz, K. B. (1998): Progesterone receptor variants found in breast cells repress transcription by wild-type receptors. In: *Breast Cancer Res. Treat.* 48 (3), S. 231–241.

- Ringberg, A.; Anagnostaki, L.; Anderson, H.; Idvall, I.; Fernö, M. (2001): Cell biological factors in ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast-relationship to ipsilateral local recurrence and histopathological characteristics. In: *European Journal of Cancer* 37 (12), S. 1514–1522.
- Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hg.) (2012): Krebs in Deutschland 2007/2008. 2008. Aufl. Berlin. Online verfügbar unter [www.rki.de/krebs](http://www.rki.de/krebs).
- Robinson, Stephen C.; Scott, Kate A.; Wilson, Julia L.; Thompson, Richard G.; Proudfoot, Amanda E. I.; Balkwill, Frances R. (2003): A chemokine receptor antagonist inhibits experimental breast tumor growth. In: *Cancer Res.* 63 (23), S. 8360–8365.
- Rodgers, W. H.; Matrisian, L. M.; Giudice, L. C.; Dsupin, B.; Cannon, P.; Svitek, C. et al. (1994): Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. In: *J. Clin. Invest.* 94 (3), S. 946–953.
- Rosa, Fabíola E.; Caldeira, José R.F.; Felipes, Joice; Bertonha, Fernanda B.; Quevedo, Francisco C.; Domingues, Maria A.C et al. (2008): Evaluation of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  and progesterone receptor expression and correlation with clinicopathologic factors and proliferative marker Ki-67 in breast cancers. In: *Human Pathology* 39 (5), S. 720–730.
- Roth, W.; Grimm, C.; Rieger, L.; Strik, H.; Takayama, S.; Krajewski, S. et al. (2000): Bag-1 and Bcl-2 gene transfer in malignant glioma: modulation of cell cycle regulation and apoptosis. In: *Brain Pathol.* 10 (2), S. 223–234.
- Rousseau-Merck, M. F.; Misrahi, M.; Loosfelt, H.; Milgrom, E.; Berger, R. (1987): Localization of the human progesterone receptor gene to chromosome 11q22-q23. In: *Hum. Genet.* 77 (3), S. 280–282.
- Rudolph, Pierre; Kühling, Heidi; Alm, Per; Fernö, Mårten; Baldetorp, Bo; Olsson, Håkan; Parwaresch, Reza (2003): Differential prognostic impact of the cyclins E and B in premenopausal and postmenopausal women with lymph node-negative breast cancer. In: *Int. J. Cancer* 105 (5), S. 674–680.
- Sahin, A. A.; Ro, J.; Ro, J. Y.; Blick, M. B.; el-Naggar, A. K.; Ordonez, N. G. et al. (1991): Ki-67 immunostaining in node-negative stage I/II breast carcinoma. Significant correlation with prognosis. In: *Cancer* 68 (3), S. 549–557.
- Sala, Arturo (2005): B-MYB, a transcription factor implicated in regulating cell cycle, apoptosis and cancer. In: *Eur. J. Cancer* 41 (16), S. 2479–2484.
- Sartorius, C. A.; Melville, M. Y.; Hovland, A. R.; Tung, L.; Takimoto, G. S.; Horwitz, K. B. (1994): A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. In: *Mol. Endocrinol.* 8 (10), S. 1347–1360.
- Sayeed, Aejaz; Konduri, Santhi D.; Liu, Wensheng; Bansal, Sanjay; Li, Fengzhi; Das, Gokul M. (2007): Estrogen receptor alpha inhibits p53-mediated transcriptional

repression: implications for the regulation of apoptosis. In: *Cancer Res.* 67 (16), S. 7746–7755.

Schisselbauer, J. C.; Silber, R.; Papadopoulos, E.; Abrams, K.; LaCreta, F. P.; Tew, K. D. (1990): Characterization of glutathione S-transferase expression in lymphocytes from chronic lymphocytic leukemia patients. In: *Cancer Res.* 50 (12), S. 3562–3568.

Schmucker, D.; Clemens, J. C.; Shu, H.; Worby, C. A.; Xiao, J.; Muda, M. et al. (2000): Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. In: *Cell* 101 (6), S. 671–684.

Sen, S.; Zhou, H.; White, R. A. (1997): A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. In: *Oncogene* 14 (18), S. 2195–2200.

Sharp, Phillip A. (1997): Split genes and RNA splicing. In: *Physiology Or Medicine, 1991-1995* 7, S. 145.

Shi, Hong; Bevier, Melanie; Johansson, Robert; Grzybowska, Ewa; Chen, Bowang; Eyfjörd, Jorunn E. et al. (2011): Single nucleotide polymorphisms in the 20q13 amplicon genes in relation to breast cancer risk and clinical outcome. In: *Breast Cancer Res Treat* 130 (3), S. 905–916.

Siggelkow, Wulf; Boehm, Daniel; Gebhard, Susanne; Battista, Marco; Sicking, Isabel; Lebrecht, Antje et al. (2012): Expression of aurora kinase A is associated with metastasis-free survival in node-negative breast cancer patients. In: *BMC Cancer* 12 (1), S. 562.

Silvestrini, R.; Benini, E.; Veneroni, S.; Daidone, M. G.; Tomasic, G.; Squicciarini, P.; Salvadori, B. (1996): p53 and bcl-2 expression correlates with clinical outcome in a series of node-positive breast cancer patients. In: *J. Clin. Oncol.* 14 (5), S. 1604–1610.

Skrzypczak, Maciej; Springwald, Anette; Lattrich, Claus; Häring, Julia; Schüler, Susanne; Ortmann, Olaf; Treeck, Oliver (2012): Expression of Cysteine Protease Cathepsin L is Increased in Endometrial Cancer and Correlates With Expression of Growth Regulatory Genes. In: *Cancer Invest* 30 (5), S. 398–403.

Slamon, D. J.; Clark, G. M.; Wong, S. G.; Levin, W. J.; Ullrich, A.; McGuire, W. L. (1987): Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. In: *Science* 235 (4785), S. 177–182.

Slamon, D. J.; Leyland-Jones, B.; Shak, S.; Fuchs, H.; Paton, V.; Bajamonde, A. et al. (2001): Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. In: *N. Engl. J. Med.* 344 (11), S. 783–792.

Slamon, D.; Godolphin, W.; Jones, L.; Holt, J.; Wong, S.; Keith, D. et al. (1989): Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. In: *Science* 244 (4905), S. 707–712.

Soria, J. C.; Jang, S. J.; Khuri, F. R.; Hassan, K.; Liu, D.; Hong, W. K.; Mao, L. (2000): Overexpression of cyclin B1 in early-stage non-small cell lung cancer and its clinical implication. In: *Cancer Res.* 60 (15), S. 4000–4004.

- Sorlie, T. (2001): Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (19), S. 10869–10874.
- Springwald, Anette; Lattrich, Claus; Skrzypczak, Maciek; Goerse, Regina; Ortmann, Olaf; Treeck, Oliver (2010): Identification of novel transcript variants of estrogen receptor  $\alpha$ ,  $\beta$  and progesterone receptor gene in human endometrium. In: *Endocr* 37 (3), S. 415–424.
- Srebrow, A. (2006): The connection between splicing and cancer. In: *Journal of Cell Science* 119 (13), S. 2635–2641.
- Stahlberg, Claudia; Pedersen, Anette Tønnes; Lynge, Elsebeth; Andersen, Zorana Jovanovic; Keiding, Niels; Hundrup, Yrsa Andersen et al. (2004): Increased risk of breast cancer following different regimens of hormone replacement therapy frequently used in Europe. In: *Int. J. Cancer* 109 (5), S. 721–727.
- Stål, Olle; Pérez-Tenorio, Gizeh; Akerberg, Linda; Olsson, Birgit; Nordenskjöld, Bo; Skoog, Lambert; Rutqvist, Lars Erik (2003): Akt kinases in breast cancer and the results of adjuvant therapy. In: *Breast Cancer Res.* 5 (2), S. R37-44.
- Stambolic, V.; Suzuki, A.; La Pompa, J. L. de; Brothers, G. M.; Mirtsos, C.; Sasaki, T. et al. (1998): Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. In: *Cell* 95 (1), S. 29–39.
- Stein, D.; Wu, J.; Fuqua, S. A.; Roonprapunt, C.; Yajnik, V.; D'Eustachio, P. et al. (1994): The SH2 domain protein GRB-7 is co-amplified, overexpressed and in a tight complex with HER2 in breast cancer. In: *EMBO J.* 13 (6), S. 1331–1340.
- Takayama, S.; Reed, J. C. (2001): Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins. In: *Nat. Cell Biol.* 3 (10), S. E237-41.
- Takayama, S.; Sato, T.; Krajewski, S.; Kochel, K.; Irie, S.; Millan, J. A.; Reed, J. C. (1995): Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. In: *Cell* 80 (2), S. 279–284.
- Takeichi, M. (1991): Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. In: *Science* 251 (5000), S. 1451–1455.
- Takeuchi, Tamotsu; Adachi, Yoshihiro; Nagayama, Tomoko; Furihata, Mutsuo (2011): Matrix metalloproteinase-11 overexpressed in lobular carcinoma cells of the breast promotes anoikis resistance. In: *Virchows Arch* 459 (3), S. 291–297.
- Tanner, M. M.; Tirkkonen, M.; Kallioniemi, A.; Holli, K.; Collins, C.; Kowbel, D. et al. (1995): Amplification of chromosomal region 20q13 in invasive breast cancer: prognostic implications. In: *Clin. Cancer Res.* 1 (12), S. 1455–1461.
- Tarn, W. Y.; Steitz, J. A. (1996): A novel spliceosome containing U11, U12, and U5 snRNPs excises a minor class (AT-AC) intron in vitro. In: *Cell* 84 (5), S. 801–811.
- Tew, K. D. (1994): Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. In: *Cancer Res.* 54 (16), S. 4313–4320.



- Thomssen, C.; Schmitt, M.; Goretzki, L.; Oppelt, P.; Pache, L.; Dettmar, P. et al. (1995): Prognostic value of the cysteine proteases cathepsins B and cathepsin L in human breast cancer. In: *Clin. Cancer Res.* 1 (7), S. 741–746.
- Townsend, Paul A.; Stephanou, Anastasis; Packham, Graham; Latchman, David S. (2005): BAG-1: a multi-functional pro-survival molecule. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 (2), S. 251–259.
- Tsutsui, Shinichi; Inoue, Hiroshi; Yasuda, Kazuhiro; Suzuki, Kosuke; Higashi, Hidefumi; Era, Shoichi; Mori, Masaki (2005): Reduced expression of PTEN protein and its prognostic implications in invasive ductal carcinoma of the breast. In: *Oncology* 68 (4-6), S. 398–404.
- van 't Veer, Laura J.; Dai, Hongyue; van de Vijver, Marc J.; He, Yudong D.; Hart, Augustinus A. M.; Mao, Mao et al. (2002): Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. In: *Nature* 415 (6871), S. 530–536.
- Vogel, C. L. (2002): Efficacy and Safety of Trastuzumab as a Single Agent in First-Line Treatment of HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer. In: *Journal of Clinical Oncology* 20 (3), S. 719–726.
- Vukanovic, J.; Isaacs, J. T. (1995): Linomide inhibits angiogenesis, growth, metastasis, and macrophage infiltration within rat prostatic cancers. In: *Cancer Res.* 55 (7), S. 1499–1504.
- Wahed, Amer; Connelly, John; Reese, Tommy (2002): E-cadherin expression in pleomorphic lobular carcinoma: an aid to differentiation from ductal carcinoma. In: *Ann Diagn Pathol* 6 (6), S. 349–351.
- Waldman, T.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. (1995): p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. In: *Cancer Res.* 55 (22), S. 5187–5190.
- Wang, Eric T.; Sandberg, Rickard; Luo, Shujun; Khrebtkova, Irina; Zhang, Lu; Mayr, Christine et al. (2008): Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. In: *Nature* 456 (7221), S. 470–476.
- Wang, Yixin; Klijn, Jan G. M.; Zhang, Yi; Sieuwerts, Anieta M.; Look, Maxime P.; Yang, Fei et al. (2005): Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. In: *Lancet* 365 (9460), S. 671–679.
- Wei, L. L.; Gonzalez-Aller, C.; Wood, W. M.; Miller, L. A.; Horwitz, K. B. (1990): 5'-Heterogeneity in human progesterone receptor transcripts predicts a new amino-terminal truncated "C"-receptor and unique A-receptor messages. In: *Mol. Endocrinol.* 4 (12), S. 1833–1840.
- Wei, L. L.; Hawkins, P.; Baker, C.; Norris, B.; Sheridan, P. L.; Quinn, P. G. (1996): An amino-terminal truncated progesterone receptor isoform, PRc, enhances progesterin-induced transcriptional activity. In: *Mol. Endocrinol.* 10 (11), S. 1379–1387.
- Winters, Z. E.; Hunt, N. C.; Bradburn, M. J.; Royds, J. A.; Turley, H.; Harris, A. L.; Norbury, C. J. (2001): Subcellular localisation of cyclin B, Cdc2 and p21(WAF1/CIP1) in breast cancer. association with prognosis. In: *Eur. J. Cancer* 37 (18), S. 2405–2412.

- Witten, Joshua T.; Ule, Jernej (2011): Understanding splicing regulation through RNA splicing maps. In: *Trends in Genetics* 27 (3), S. 89–97.
- Woessner, J. F. (1991): Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. In: *FASEB J.* 5 (8), S. 2145–2154.
- Wright, C.; Nicholson, S.; Angus, B.; Sainsbury, J. R.C.; Farndon, J.; Cairns, J. et al. (1992): Relationship between c-erbB-2 protein product expression and response to endocrine therapy in advanced breast cancer. In: *Br J Cancer* 65 (1), S. 118–121.
- Xiong, Yue; Hannon, Gregory J.; Zhang, Hui; Casso, David; Kobayashi, Ryuji; Beach, David (1993): p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. In: *Nature* 366 (6456), S. 701–704.
- Yager, James D.; Davidson, Nancy E. (2006): Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. In: *N Engl J Med* 354 (3), S. 270–282.
- Yamanaka, Tomoya; Hirata, Shuji; Shoda, Tomoko; Hoshi, Kazuhiko (2002): Progesterone Receptor mRNA Variant Containing Novel Exon Insertions between Exon 4 and Exon 5 in Human Uterine Endometrium. In: *Endocr J* 49 (4), S. 473–482.
- Yamashita, Hiroko; Toyama, Tatsuya; Nishio, Mariko; Ando, Yoshiaki; Hamaguchi, Maho; Zhang, Zhenhuan et al. (2006): p53 protein accumulation predicts resistance to endocrine therapy and decreased post-relapse survival in metastatic breast cancer. In: *Breast Cancer Res.* 8 (4), S. R48.
- Yang, Ruey-Bing; Ng, Chi Kin Domingos; Wasserman, Scott M.; Colman, Steven D.; Shenoy, Suresh; Mehraban, Fuad et al. (2002): Identification of a novel family of cell-surface proteins expressed in human vascular endothelium. In: *J. Biol. Chem.* 277 (48), S. 46364–46373.
- Yarden, Y.; Sliwkowski, M. X. (2001): Untangling the ErbB signalling network. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (2), S. 127–137.
- Yip, K. W.; Reed, J. C. (2008): Bcl-2 family proteins and cancer. In: *Oncogene* 27 (50), S. 6398–6406.
- Youle, Richard J.; Strasser, Andreas (2008): The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (1), S. 47–59.
- Zhang, Xiaohui; Moor, Andrea N.; Merkler, Kathleen A.; Liu, Qiyuan; McLean, Mark P. (2007): Regulation of alternative splicing of liver scavenger receptor class B gene by estrogen and the involved regulatory splicing factors. In: *Endocrinology* 148 (11), S. 5295–5304.
- Zhang, Y.; Bai, W.; Allgood, V. E.; Weigel, N. L. (1994): Multiple signaling pathways activate the chicken progesterone receptor. In: *Mol. Endocrinol.* 8 (5), S. 577–584.
- Zhou, H.; Kuang, J.; Zhong, L.; Kuo, W. L.; Gray, J. W.; Sahin, A. et al. (1998): Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. In: *Nat. Genet.* 20 (2), S. 189–193.

Zhu, Ning; Eghbali, Mansoureh; Helguera, Gustavo; Song, Min; Stefani, Enrico; Toro, Ligia (2005): Alternative splicing of Slo channel gene programmed by estrogen, progesterone and pregnancy. In: *FEBS Lett.* 579 (21), S. 4856–4860.

## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Olaf Ortmann für die Möglichkeit der Arbeit an diesem interessanten Thema sowie die Bereitstellung der benötigten Materialien und eines Arbeitsplatzes im Labor. Mein Dank gilt im Besonderen auch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Oliver Treeck für seine Betreuung während der Planung, Durchführung bis hin zur Fertigstellung der Arbeit sowie für seinen fachlichen Beistand.

Darüber hinaus möchte ich mich beim ganzen Laborteam für das nette Arbeitsklima sowie die stets freundliche Hilfe und Unterstützung während meiner Arbeit danken.

Außerordentlicher Dank gilt meiner Familie, die mir während meiner Arbeit stets unterstützend zur Seite stand und die mir mein Studium der Humanmedizin ermöglichten. Danke für eure Zuversicht, eure guten Zusprüche und eure Hilfe. Meiner Schwester danke ich für die liebevolle Fürsorge während dem Schreiben meiner Dissertation.

Ein großer Dank geht in diesem Zusammenhang auch an meinen Partner, der mir immer zur richtigen Zeit mit guten Ratschlägen, Aufmunterungen sowie großem Rückhalt und viel Geduld zur Seite stand.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift)